АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIX. ВЫП. 4

ИЮЛЬ—АВГУСТ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1950

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ «МИКРОБИОЛОГИЯ» ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА «АКАДЕМКНИГА».

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

НЕКОТОРЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ НАД РАЗВИТИЕМ VIBRIO DESULFURICANS В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Л. Д. Штурм

Vibrio desulfuricans относится, как известно, к облигатным анаэробам. Beijerinck [7], открывший этот микроорганизм, неоднократно указывал на то, что он не развивается в присутствии кислорода воздуха.

Дальнейшее изучение бактерий, восстанавливающих сульфаты, подтвердило эти наблюдения. Действительно, многие авторы обращают внимание на то, что V. desulfuricans не растет в аэробных условиях (Губин [1]; Исаченко [2]; Рубенчик [3]; Baars [6]).

В последние годы, однако, появились новые данные, согласно которым кислород воздуха не оказывает столь гибельного воздействия на V. desulfuricans, как это полагали раньше [9].

Так, было установлено, что клетки V. desulfuricans в поверхностных колониях, полученных при выращивании микроорганизма в анаэробных условиях, сохраняют свою подвижность спустя 24 часа и более после того, как пластинки агара были вынуты из эксикатора [9]. Кроме того, культура хорошо развивалась по уколу на пептон-глюкозном агаре с сульфатами, если даже пробирки не были плотно закрыты. В этих условиях рост начинался с глубины 5 мм от поверхности среды.

Посевы же мазком по поверхности питательных сред давали отрицательные результаты. Подобные наблюдения приводятся и в более поздних работах [8]. Beijerinck полагал также, что V. desulfuricans не способен развиваться на средах, не содержащих сульфатов или других менее окисленных соединений серы. Многие позднейшие исследования подтверждают этот взгляд [1, 2].

Однако более детальное изучение бактерий, восстанавливающих сульфаты, показало, что V. desulfuricans может, хотя и слабо, расти в анаэробных условиях на средах без сульфатов [6, 9]. При этом микроорганизм сохраняет присущую ему форму вибриона (МПБ и пептоно-глюкозные среды).

Для выделения V. desulfuricans были предложены различные методы, основанные на свойствах микроорганизма, указанных выше (неспособность развиваться в аэробных и анаэробных условиях в отсутствие сульфатов).

Не входя в рассмотрение отдельных методов, укажем только, что все исследователи вели культуру в строго анаэробных условиях, достигая последних различными способами. Источником углерода чаще всего служили соли молочной кислоты, источником азота — хлористый аммоний, источником серы — сульфаты.

Культура считалась чистой, если она не давала роста на обычных мясопептонных средах в аэробных условиях.

Изучая бактерий, восстанавливающих сульфаты, из нефтяных месторождений, мы столкнулись с некоторыми фактами, которые заставили нас подробнее исследовать вопрос о способности V. desulfuricans развиваться в аэробных условиях. Изложению этих данных и посвящена настоящая работа.

Исходным материалом для выделения чистой культуры V. desulfuricans являлась пластовая вода из третичных отложений нефтяного месторождения Чангыр-Таш с глубины около 900 м. Вода отличалась довольно значительным содержанием NaCl и сероводорода.

Для получения накопительных культур употреблялась жидкая среда следующего состава (видоизмененная среда Таусон [4]): водопроводная вода — 1 л; $(NH_4)_2SO_4$ — 4 г; $KHPO_4$ — 0,5; $MgSO_47H_2O$ — 1 г; $CaSO_4$ — 5 г; $CaCO_3$ — 5 г; NaCl — 30 г; соль Мора — 0,5 г; $(C_3H_5O_3)_2Ca$ — 5 г.

Среда наливалась в небольшие склянки (60—100 мл) и стерилизовалась при 115°; pH среды 7,2—7,5. Непосредственно перед заражением из среды удаляли воздух кипячением; после заражения склянки заполнялись доверху и плотно закрывались.

В этих условиях уже в первом посеве наблюдалось интенсивное образование в среде сероводорода и массовое развитие вибрионов и коротких спирилл. Выделение чистой культуры производилось на плотной среде того же состава. Для этой цели пластинки агара заражались накопительной культурой, взятой в пяти последовательных разведениях в отношении 1:10 (для разведения употреблялась вышеуказанная жидкая среда в пробирках). Зараженные пластинки помещали в эксикатор, из которого выкачивали воздух, а затем вводили некоторое количество сероводорода. Температура культивирования — 35°.

Уже на вторые-третьи сутки на пластинках агара было хорошо заметно развитие бактерий, восстанавливающих сульфаты. В высоких разведениях (10^{-3}—10^{-5}) появлялись отдельно лежащие черные колонии 1—2 мм диаметром. В первых разведениях наблюдалось обычно диффузное почернение пластинок агара. Развитие происходило в строго анаэробных условиях, что хорошо было заметно по серому цвету контрольных чашек Петри.

Материалом из колоний в различных разведениях снова заражали плотную среду в чашках Петри и помещали пластинки в эксикатор, после чего в него вводили сероводород. Кроме того, колонии вносили в жидкую среду вышеуказанного состава, разлитую в пробирки, закрытые ватными пробками. Культуры выращивались также в эксикаторе в атмосфере сероводорода. Было выяснено, что в этих условиях в среде быстро создается низкий окислительно-восстановительный потенциал, так как раствор метиленовой сини, помещенный в одну из пробирок, вскоре обесцвечивался.

Таким образом, был получен ряд культур, которые не давали роста на мясопептонном агаре и мясопептонном бульоне в аэробных условиях при заражении небольшим количеством (1—2 петли осадка).

В молодом возрасте культура состояла из палочковидных форм и вибрионов с одним жгутом на конце, что было установлено с помощью электронного микроскопа. Короткие и длинные спириллы содержались в небольшом количестве (рис. 1). Культуры не развивались на средах с единственным источником органического вещества в виде солей жирных кислот (уксусной и масляной) и потому были идентифицированы с V. desulfuricans.

В дальнейшей работе, однако, накопились данные, которые заставили пересмотреть вопрос о способности V. desulfuricans развиваться в аэробных условиях.

Так было замечено, что некоторые культуры не давали роста на мясопептонных средах, если среда заражалась небольшим количеством посевного материала; если же в пробирку вносили 0,2—0,5 мл культуры, то развитие наблюдалось. Часть культур, однако, не давала роста на мясопептонных средах даже при заражении большим количеством посевного материала. Этот посевной материал, внесенный в пробирки с косым мясопептонным агаром, был использован для получения культур на жидкой среде с сульфатами. Дальнейшее испытание показало, что полученные культуры могли давать рост на мясопептонных средах.

Точно так же старые одно-, двухгодичные культуры не всегда да-

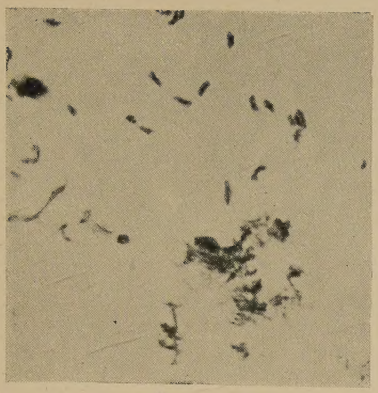


Рис. 1

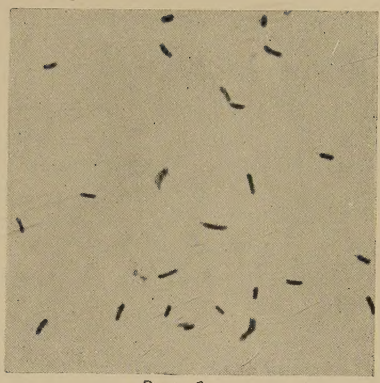


Рис. 2

Рис. 3

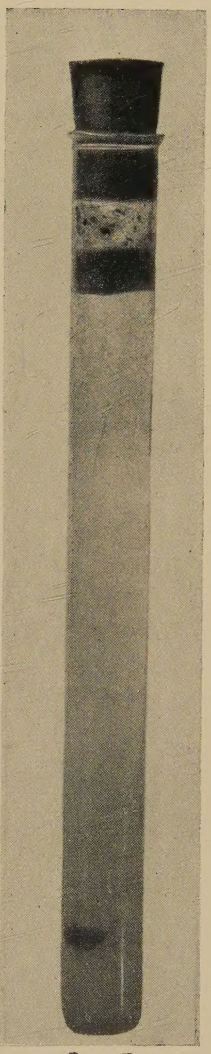


Рис. 5

Рис. 4

Рис. 1. V. desulfuricans на жидкой среде с сульфатами. Десятисуточная культура, ×1000.
Рис. 2. V. desulfuricans на косом МПА. Односуточная культура, четвертый пассаж, ×1000.
Рис. 3. V. desulfuricans на косом МПА. Двухсуточная культура, четвертый пассаж, ×1000.
Рис. 4. V. desulfuricans на косом МПА. Семисуточная культура, четвертый пассаж, ×1000.
Рис. 5. Развитие V. desulfuricans на поверхности жидкой среды с сульфатами.

вали рост на мясопептонных средах; но эти же культуры, восстановленные путем последовательных пересевов, обладали способностью развиваться на поверхности МПА.

Указанные наблюдения, проводившиеся в течение ряда лет на большом материале, сопровождались одновременно изучением роста культур, развившихся на мясопептонных средах, и микроскопическим исследованием. В результате этих исследований было установлено, что характер роста на мясопептонных средах культур, полученных в различное время из отдельных колоний V. desulfuricans, отличается сходными чертами.

Обычно первый посев активной молодой культуры V. desulfuricans в МПБ дает хорошее развитие. МПБ становится мутным в первые же сутки, а на дне появляется осадок, постепенно увеличивающийся. Микроскопическое исследование показывает, что при обильном заражении в среде развиваются преимущественно вибрионы. Палочковидные формы находятся в меньшем количестве. При заражении небольшим количеством осадка (несколько петель) развиваются палочки, короткие в первые сутки и более длинные нитевидные формы на вторые — пятые сутки. Часто смесь этих форм наблюдалась в первые же сутки. Последующие посевы на МПБ совсем не дают роста, или же дают крайне слабый медленный рост, появляющийся через 10 суток и позднее. Третий последовательный посев на МПБ дает положительные результаты лишь как исключение.

Во втором и третьем последовательных посевах развиваются также палочковидные и нитевидные формы.

Косой МПА заражали обычно молодой культурой V. desulfuricans на указанной жидкой среде. При этом посевной материал в количестве 0,2—0,5 мл вносится в нижнюю часть пробирки, не касаясь поверхности агара.

Через сутки на агаре появляется сплошной тонкий налет, голубоватый в проходящем свете и грязнобелого цвета в отраженном свете. Поверхность налета гладкая, блестящая, край мелко гофрированный; консистенция налета слизистая; материал с трудом берется петлей.

В первые сутки на МПА развиваются короткие палочки — 0,4—0,6 $\mu \times 1\ \mu - 2\ \mu$ (рис. 2).

Но уже на вторые сутки они сильно увеличиваются и переходят в короткую слабо изогнутую нить (рис. 3).

На пятые — седьмые сутки вся культура состоит из чрезвычайно длинных нитей, часто спутанных в виде войлока (рис. 4).

Последующие посевы на МПА дают тот же характер роста и ту же морфологическую культуру. Однако развитие микроорганизма в четвертом и пятом последовательных посевах уже заметно ослабевает. Сравнивая рост микроорганизма на МПА и МПБ, можно было видеть, что он гораздо лучше развивается на МПА, чем на МПБ. В этом нас убеждало также то обстоятельство, что посевы культуры с МПА на МПБ чаще всего не давали развития, хотя одновременно посев из этой же культуры на МПА давал рост.

На поверхности пластинок МПА культура образовала мелкие колонии — нежные голубоватые в проходящем свете и бесцветные полупрозрачные в отраженном. Средняя часть колоний более плотная, край волнистый. В этих колониях наблюдались те же формы и в той же последовательности, как на косом МПА.

Путем последовательных посевов на пластинки МПА (посев штрихом) был получен ряд культур из второго и третьего пассажей. Они не отличались от культур, полученных при непосредственном заражении мясопептонных сред культурой V. desulfuricans на указанной среде с сульфатами.

Изучая развитие микроорганизма, нельзя было не обратить внима-

ния на то, что он образовал на мясопептонных средах формы, наблюдавшиеся другими авторами у V. desulfuricans при изменении температуры культивирования. Так, например, образование нитевидных и более коротких, слегка изогнутых клеток в культуре V. desulfuricans наблюдалось в первом посеве при резком понижении температуры выращивания с 55 до 30°. В последующих культурах при 30° клетки постепенно принимали форму короткого вибриона или спириллы [9]. Выделенная нами культура образовала палочковидные и нитевидные клетки не только на мясопептонных средах, но и на среде с сульфатами при повышении температуры культивирования с 35 до 40°.

Дальнейшее повышение температуры с 40 до 45° подавляло развитие, несмотря на то, что для заражения употреблялась культура, выдержавшая несколько последовательных пересевов при 40°.

Сходство форм, наблюдавшихся в культурах на мясопептонных средах и на средах с сульфатами, при резком изменении условий культивирования говорило в пользу того, что культуры являются идентичными. На средах с сульфатами эти формы следует рассматривать как отклонения от нормального типа вибрионов. По мере того как культура приспособлялась к новым условиям, нитевидные формы заменялись короткими вибрионами [9]. Исследованные нами культуры давали на МПА только слабо изогнутые палочковидные и нитевидные клетки, являющиеся, вероятно, также инволюционными формами. Объясняется это, повидимому, тем, что микроорганизм мог адаптироваться к аэробным условиям существования лишь в слабой мере. Действительно, как указывалось выше, он выдерживал не более трех последовательных пересевов на МПБ и не более пяти на МПА.

Таким образом, морфологические наблюдения над культурой на мясопептонных средах оказались недостаточными для того, чтобы установить с несомненностью, относится ли испытуемый микроорганизм к роду Vibrio. Перед нами стояла задача выяснить, способна ли культура, полученная на мясопептонных средах, развиваться и восстанавливать сульфаты в анаэробных условиях и каковы будут ее морфологические особенности.

Эта задача оказалась гораздо более трудной, чем в случае Ps. Zelinskii [5]. После многих неудачных опытов положительные результаты были получены в следующих условиях. Молодая одно-двухсуточная культура V. desulfuricans на косом МПА в пробирке заливалась почти доверху вышеуказанной средой и плотно закрывалась стерильной каучуковой пробкой. Между средой и пробкой оставался слой воздуха в 1—2 см толщиной. Спустя несколько месяцев на поверхности среды развивалась нежная бесцветная пленка островками. Пленка сначала постепенно окрашивалась в бурый цвет, а затем чернела и поднималась по стенкам пробирки (рис. 5). В нижней части пробирки почернение обычно не наблюдалось. Можно было видеть лишь черные не связанные друг с другом хлопья, вероятно частицы опадающей пленки. Такие культуры очень чувствительны и требуют длительного покоя — от нескольких месяцев до года, а иногда и более, после чего может быть сделан пересев на среду с сульфатами в строго анаэробных условиях. Таким путем были получены культуры, хорошо развивающиеся в анаэробных условиях и энергично восстанавливающие сульфаты. В этих культурах микроорганизм имел вид вибриона или короткой спириллы.

Изложенные выше данные привели нас к заключению, что культура, развивавшаяся на мясопептонных средах, является сульфатвосстанавливающим микроорганизмом.

Как отмечалось выше, для развития в анаэробных условиях культур, выросших на косом МПА, последние заливали почти доверху жидкой средой с сульфатами и плотно закрывали каучуковой пробкой. Развитие микроорганизма в этих условиях происходит на поверхности

жидкости под слоем воздуха 1—2 см (рис. 5). Это указывает на то, что ему требуется некоторое количество кислорода. Развитие сначала не сопровождается восстановлением сульфатов, и лишь спустя долгое время пленка начинает чернеть.

Чем же объясняется такой непостоянный, «случайный» рост V. desulfuricans на мясопептонных средах? Проведенное исследование позволяет высказать следующее. Способность V. desulfuricans расти в аэробных условиях зависит, повидимому, от стадии развития микроорганизма. Чаще всего на косом МПА дают рост молодые, сульфатвосстанавливающие активные культуры V. desulfuricans. Кроме того, повидимому, очень немногие клетки культуры обладают способностью приспосабливаться к аэробным условиям, перестраивая свою ферментативную систему; как правило, для заражения косого МПА требуется большое количество посевного материала.

Выводы

1. Vibrio desulfuricans обладает некоторой способностью развиваться в аэробных условиях на мясопептонных средах в отсутствие сульфатов. На МПА удавалось получить рост культуры в пятом последующем посеве; на МПБ обычно только в первом, реже во втором и как исключение в третьем.

2. Культивирование V. desulfuricans в аэробных условиях вызывает морфологические изменения: клетки принимают палочковидные или нитевидные формы, сходные с формами, появляющимися при резком изменении температуры в анаэробных условиях культивирования на средах с сульфатами.

3. Культура, адаптированная к аэробным условиям, может быть снова адаптирована к анаэробному существованию, но этот процесс требует длительного времени и специальных условий.

4. Выяснение способности V. desulfuricans развиваться аэробно, хотя и слабо, имеет большое значение в работе с сульфатвосстанавливающими бактериями, так как до настоящего времени отсутствие роста на мясопептонных средах служило признаком чистоты культуры. Развитие V. desulfuricans в аэробных условиях характеризуется вполне определенной морфологической картиной, что позволяет отличать этот микроорганизм от сопутствующей флоры.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 1.IX.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Губин В. М. О биохимическом происхождении сероводорода в минеральных источниках. Курортно-санитарное дело, № 5, стр. 3, 1929.
2. Исаченко Б. Л. Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана. СПб., 1914.
3. Рубенчик Л. М. Сульфатредуцирующие бактерии. Изд. АН СССР, Москва — Ленинград, 1947.
4. Таусон В. О. О восстановлении сульфатов бактериями в присутствии углеводородов. Микробиология, I, вып. 3, 1932.
5. Штурм Л. Д. Восстановление сульфатов факультативно-аэробными бактериями. Микробиология, XVII, вып. 6, стр. 415, 1948.
6. Baars J. R. Over sulfaat reductie door bacterien. Delft. Dissert. 1930.
7. Beijerinck M. W. Über Spirillum Desulfuricans als Ursache von Sulfatreduction. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 1, 48, 104, 1895.
8. Butlin M., Adams E. and Thomas M. The isolation of sulfat-reducting Bacteria. J. Gen. Microb., 3, No. 1, pp. 46, 1949.
9. Starkey R. L. A study of spore formation and other morphological characteristics of Vibrio desulfuricans. Arch. Microbiol., 9, 268, 1938.

РЕАКЦИИ РАСПАДА И СИНТЕЗА ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ ЖИРА БАКТЕРИЯМИ, ВОССТАНАВЛИВАЮЩИМИ СУЛЬФАТЫ

Г. Л. Селибер

На возможность разложения жира бактериями, восстанавливающими сульфаты, мной было впервые указано в 1928 г. В статьях, опубликованных в 1931 и 1937 гг. [1] и в 1945 г. [2], был приведен ряд данных, полученных путем анализа остаточного жира культур бактерий, восстанавливающих сульфаты, с растительными маслами и твердым животным жиром; в этих статьях были высказаны также некоторые теоретические соображения в связи с предположением о возможности участия этих бактерий в образовании нефти, т. е. в образовании углеводородов из жиров.

Полученные данные показали, что бактерии, восстанавливающие сульфаты, потребляют жир и вызывают сильное расщепление как растительных масел, так и твердых животных жиров. Укажем, что в культурах с растительными маслами последние наливались высоким слоем над минеральным раствором. В культурах с животным жиром последний находился под высоким слоем минерального раствора. При анализах нас, кроме кислотного числа, особенно интересовали числа омыления и иодное; неомыляемые вещества были определены только в нескольких случаях.

Что касается числа омыления, то для ряда фракций остаточного жира, как и для жира, извлеченного целиком, были получены пониженные цифры; приведем некоторые из этих цифр: 140,09; 147,16; 92,85; 89,6. Отметим, что продукт, давший число омыления 140,09, после перекристаллизации из спирта имел число омыления 63,27 [1].

При определении неомыляемой части одной из фракций твердого жира мы получили следующие числа: 15,5%, 6,6%, 5,4%.

Хотя мы углеводородов в чистом виде не получили, но эти данные так же, как некоторые теоретические соображения, нам, казалось, давали право поддерживать наше первоначальное предположение о возможном участии бактерий, восстанавливающих сульфаты (или их предков), в процессе образования нефти.

В нашем сообщении 1945 г. мы говорили и о возможных синтетических процессах из продуктов распада жиров.

Из результатов этих исследований следует отметить случаи повышения иодных чисел в остаточном жире культур с твердым животным жиром. В одном случае для части, извлеченной непосредственно эфиром, было получено иодное число 125,0; для части же, извлеченной после обработки кислотой, иодное число 96,6. В двух других случаях часть, извлекавшаяся непосредственно эфиром, дала иодные числа 110 и 77.

В 1947 г. мы имели возможность подвергнуть анализу остаточный жир ряда культур, засеянных в 1930 г. Эти культуры стояли в лабора-

---

[1] Мы в данном случае имели дело с культурой, зараженной шишакским илом, и через 4 месяца несерными пурпурными бактериями. Культура сначала находилась в темноте, затем подвергалась действию электрического света. Шишакский ил — ил реки Псел села Шишаки, Полтавской области.

тории до 1942 г., затем с них был слит минеральный раствор и в колбах оставался остаточный жир. О том, что это не повлекло за собой особых изменений, свидетельствуют полученные нами в ряде образцов относительно высокие иодные числа.

Результаты этих исследований были опубликованы в 1948 г.

В течение 1948 г. анализу был подвергнут остаточный жир ряда других культур. В табл. 1 и 2 мы приводим результаты этих исследований вместе с константами остаточного жира, полученными в 1947 г.

Таблица 1

Анализ остаточного жира, полученного в культурах бактерий, восстанавливающих сульфаты, с твердым животным жиром

Род жира и посевной материал	Иодное число	Кислотное число	Число омыления	Неомыляемые вещества в %
Бычий жир, засеян илом Одесского залива	14,9	141,02	141,02	6,9
Говяжий жир, засеян илом Одесского залива	25,15	173,14	201,01	4,15
Бычий жир, засеян культурой бактерий, восстанавливающих сульфаты	17,21	91,50	174,67	17,6
Бычий жир — контроль	37,25	34,20	216,17	0,25
Говяжий жир, засеян культурой бактерий, восстанавливающих сульфаты	17,16	102,12	212,68	1,7
То же	80,0	99,81	174,10	0,08
Бычий жир, засеян культурой, восстанавливающей сульфаты	23,3	—	214,08	0,44
То же	18,84	—	222,7	0,526
Бычий жир, засеян лесным суглинком	31,4	—	214,7	0,388

Таблица 2

Анализ остаточного жира культур бактерий, восстанавливающих сульфаты с растительным маслом

Род масла и посевной материал	Иодное число	Кислотное число	Число омыления	Неомыляемые вещества в %
Подсолнечное масло, засеяно культурой бактерий, восстанавливающих сульфаты	51,96	165,42	166,19	0,49
То же	61,29	132,96	134,99	1,13
„ „	37,12	193,40	232,94	1,3
„ „	48,14	—	229,0	0,564
„ „	60,74	—	195,15	0,472
„ „	86,72	—	188,5	0,328
Подсолнечное масло, засеяно илом Одесского залива	77,1	165,82	175,1	1,01
Оливковое масло, засеяно первоначальными накопительными культурами	54,2	—	215,6	0,512

Эти данные показывают, что твердый животный жир после действия на него бактерий, восстанавливающих сульфаты, дает большей частью повышение процентного содержания неомыляемых веществ. Это было особенно резко выражено в остаточном жире трех культур (4,15%, 6,9% и 17,6%), в четырех других случаях (1,7% 0,526%, 0,44% и 0,388%) имеется более или менее значительное увеличение, которое, однако, не сравнимо с увеличением, полученным для упомянутых выше куль-

тур; в одном случае процентное содержание этих веществ значительно понизилось (0,08 вместо 0,25% для контроля). В остаточном жире культур с подсолнечным маслом, для которого нормальным содержанием неомыляемых веществ можно считать 0,3%, мы в одном случае имеем число, близкое к нормальному, именно 0,328%, во всех других случаях мы имеем более или менее увеличенное содержание неомыляемых (1,3%, 1,13%, 1,01%, 0,49% и 0,472%).

Что касается чисел омыления, то для культур с твердым жиром мы в двух случаях из восьми имеем пониженные числа омыления: 141,02 при содержании неомыляемых 6,9% и 174,1 при содержании неомыляемых 0,08%. В остаточном жире культур с подсолнечным маслом из семи образцов три показали пониженные числа омыления: 134,99 при содержании неомыляемых 1,13%, 166,19 при содержании неомыляемых 0,49% и 175,1 при содержании неомыляемых 1,01%.

Мы указывали, что для жиров, с которыми мы работали, нормальным числом омыления является 190—200. Поэтому следует предполагать, что наряду с реакциями распада при разложении жира бактериями, восстанавливающими сульфаты, идут реакции синтеза. Если в исходном материале имелись кислоты с C_{18}, то полученные числа омыления соответствуют кислотам с C_{20}, C_{22}, C_{24}, C_{26} и выше; мы принимаем при этом во внимание числа омыления прежних исследований. Это предположение подтверждается результатами, которые получили Jankowski и ZoBell. Эти исследователи из жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, каприновой, стеариновой и молочной) под действием бактерий, восстанавливающих сульфаты, получили смесь алифатических углеводородов от C_{10} до C_{25}. Результаты опытов американских исследователей можно объяснить только образованием метиленовых групп из CO_2 или CO и H_2. Идет ли этот синтез с самого начала, с образования метиленовых групп или же при образовании высокомолекулярных углеводородов метиленовые группы сначала служат для удлинения цепи кислоты, а декарбоксилирование идет потом,— этот вопрос подлежит дальнейшему выяснению.

В пользу того, что при разложении жира бактериями, восстанавливающими сульфаты, наряду с реакциями распада идут синтетические процессы, говорит полученное нами высокомолекулярное неомыляемое вещество с молекулярным весом 630 [2].

Как идет распад жира? В предыдущих работах указывалось на большие кислотные числа, полученные при разложении как растительных масел, так и твердых животных жиров. Следует, однако, отметить, что не все источники, содержащие зародыши бактерий, восстанавливающих сульфаты, при всех условиях дают при заражении ими одинаковые кислотные числа.

О распаде жира и жирных кислот мы судим по числам омыления. Увеличение числа омыления показывает, что средний молекулярный вес жирных кислот понизился. Среди чисел омыления (табл. 1 и 2) мы находим цифры 222,7; 229,0; 232,94. В наших предыдущих исследованиях мы для отдельных фракций получили числа омыления: 302,35, 333,73 и 484,81; эти цифры говорят о более глубоком распаде жирных кислот при разложении жира бактериями, восстанавливающими сульфаты.

Таким образом, полученные нами данные дают нам основание утверждать, что при разложении жира интересующими нас здесь бактериями одновременно с реакциями распада идут реакции синтеза.

Говоря о превращениях, претерпеваемых жирами при действии на них десульфурирующих бактерий, следует упомянуть и возможное повы-

[2] Более подробная характеристика этого вещества с температурой плавления 54,5° дана в нашем предыдущем сообщении [3].

шение иодного числа; в прежних исследованиях мы имели несколько таких случаев, в настоящих исследованиях мы встретились с одним случаем (иодное число говяжьего жира 80 вместо нормального 32—47).

Подводя итоги сказанному выше, следует признать вероятным участие бактерий, восстанавливающих сульфаты, и их предков в образовании из жира сапропелевых пород и, в частности, нефти. Материалом для образования сапропелитов могут служить как животные жиры, так и растительные масла. Не исключена вероятность, что углеводороды или соединения, близкие к ним, образовались из жирных кислот, получившихся путем дезаминирования аминокислот или при сбраживании углеводов микроорганизмами.

Укажем, что впервые высказанное нами в 1928 г. предположение о возможном участии бактерий, восстанавливающих сульфаты, в образовании нефти сначала встретило скептическое отношение; критически к нему отнесся Baars [5].

Работы 1930 и 1937 гг. [1] и 1945 г. [2] дали химические показатели для обоснования этого предположения. Последнее получило прямое подтверждение в исследованиях Jankowski и ZoBell [6]. Данные, приводимые в нашем предыдущем сообщении [3] и в настоящей работе, расширяют прежние результаты по вопросу о возможном участии десульфурирующих бактерий и их предков в геологических процессах, указывая на то, что они могли принимать участие в образовании и нефти и сапропелевых пород в более широком смысле этого слова.

Выводы

1. При разложении жира бактериями, восстанавливающими сульфаты, наряду с реакциями распада могут протекать и реакции синтеза.
2. При разложении жиров бактериями, восстанавливающими сульфаты, в ряде случаев увеличилось количество неомыляемых веществ.
3. Понижение числа омыления для некоторых образцов жира указывает на возможность удлинения углеродной цепи под влиянием бактерий, восстанавливающих сульфаты, т. е. на синтетическую деятельность этих бактерий. Об этом же свидетельствует полученное высокомолекулярное вещество с молекулярным весом 630.
4. Не исключена вероятность, что бактерии, восстанавливающие сульфаты, образуя из CO_2 или CO и H_2 метиленовые группы, потом синтезируют из последних углеводороды.
5. При разложении твердого животного жира бактериями, восстанавливающими сульфаты, в ряде случаев получились соединения с иодным числом более высоким, чем у исходного жира.
6. Не исключена вероятность, что более детально исследованное неомыляемое вещество представляло собой смесь углеводородов с более восстановленным по сравнению с исходным веществом соединением, содержащим кислород и близким к углеводородам.
7. Полученные на основании всех произведенных исследований результаты говорят в пользу того, что бактерии, восстанавливающие сульфаты, и их предки могли и могут принимать участие в образовании сапропелевых пород вообще и нефти в частности.

Государственный естественно-научный институт
им. П. Ф. Лесгафта
Ленинград

Получено 20.IX.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Селибер Г. Л., Кацнельсон Р. и Седых А. Разложение жира при восстановлении сульфатов микроорганизмами. Сообщ. I. Архив биологич. наук, **31**, 25, 1931. Сообщ. II, Изв. Научн. ин-та им. Лесгафта, XX, 3, 1937.

2. Селибер Г. Л. К вопросу об образовании углеводородов из жиров микроорганизмами. Микробиология, XIV, 254, 1945.
3. Селибер Г. Л. Об отношении бактерий, восстанавливающих сульфаты, к жирам. ДАН СССР, LXII, № 4, 533, 1948.
4. Селибер Г. Л. La réduction des sulfates par des microorganismes en présence des graisses. C. R. Soc. Biol., 99, 544, 1928.
5. Baars J. K. Over Sulfatreductie door Bacterien. Delft, 1930.
6. Jankowski G. and ZoBell C. Hydrocarbon Production by Sulfatereducing Bacteria. J. Bact., 47, 447, 1944.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПОЯСА ГОР И ИХ ОТРАЖЕНИЕ В СОСТАВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО НАСЕЛЕНИЯ ПОЧВЫ

Е. Н. Мишустин и *В. А. Мирзоева*

В предыдущей статье один из авторов настоящей работы (Мишустин [5]) продемонстрировал наличие теснейшей взаимосвязи между направленностью почвообразовательного процесса и составом бактериального населения почвы.

Из отмеченной работы видно, что в природе не существует, как это обычно принималось, вульгарного космополитизма почвенных микробов. В различных почвах те же бактерии образуют весьма характерные ассоциации. Их состав определяется совокупностью факторов, под воздействием которых протекает почвообразовательный процесс. Было также отмечено, что окультуривание почвы чрезвычайно заметно отражается на составе ее бактериального населения.

Здесь мы не предполагаем давать какие-либо теоретические обоснования отмеченным закономерностям. Они вытекают из основных принципов учения Докучаева [2], Костычева [3] и Вильямса [1, 2] о почве. Это с достаточной полнотой нами было разобрано уже ранее [5, 6].

В основном мы экспериментировали с группой бациллярных форм, наиболее часто встречающиеся представители которых изучены с достаточной полнотой.

В настоящем очерке вниманию предлагается материал, вполне подтверждающий сделанные ранее наблюдения. Он был получен при изучении горных почв Армении, расположенных на различных высотах и формирующихся под различной растительностью. В горах, на относительно небольших расстояниях, по мере подъема сильно меняются растительные формации и климатические условия, что накладывает явный отпечаток на ход почвообразовательных процессов, включающих, конечно, и деятельность микроорганизмов.

Зональность, как горизонтальную, так и вертикальную, нельзя понимать как чередование правильно очерченных полос. Это понятие включает не только представление о пространстве, но и о времени, на что указывал Вильямс.

Легкая доступность некоторых достаточно высоких гор Армении, как, например, Алагеза (Арагац), делает возможным собирание почвенного материала от вершины до основания горы в течение одного дня. Это позволяет быстро и одновременно проанализировать в совершенно тождественной обстановке и на средах одной варки весьма различные почвы. Таким путем устраняются все сомнения, основанные на допущении тех или иных методических ошибок. Подобная возможность нас прельщала, так как она позволяла проверить положения, к которым мы пришли при изучении почв, расположенных на равнинной части Европейской части СССР.

Указанная работа была проведена в условиях экспедиционной работы в течение осени 1947 и 1948 гг. Пользуясь любезным содействием директора сектора микробиологии Академии Наук Армянской ССР А. К. Паносян, мы совершили несколько маршрутных поездок, при которых был собран значительный набор почвенных образцов. Они были проанализированы с целью выявления состава спорообразующих бактерий. Напомним, что, по нашим представлениям, видовой

Состав спороносных бактерий

(Число бактерий в тыся

№ п/п	Характер исследованных почв	Общее число бактерий в непастер. посеве	Пастеризованный посев						
			Общее число спор	Bac. agglomeratus	Bac. cereus	Bac. mycoides	Bac. idosus	Bac. megatherium	Bac. mesentericus
	Целинные почвы								
1	Высота 4 000 м, неоформленная слабо развитая почва .	190,0	5,0	4,0	0	0	0	0	0
2	Там же, обр. № 2	105,0	2,0	1,8	0	0	0	0	0
3	Высота 3 600 м, слабо развитая почва	100,0	4,0	3,0	0	0	0	0	0
4	Там же, под дерниной растений	3 700,0	12,0	8,0	1,0	0	0	0	0
5	Высота 3 200 м, альпийская зона, почвы под ковром трав	960,0	79,0	73,0	1,0	0	1,0	0	0
6	Там же, проба № 2	1 500,0	143,0	127,0	10,0	0	6,0	0	0
7	Высота 2 100 м, горно-луговая почва	5 700,0	296,0	50,0	21,0	4,0	141,0	12,0	0
8	Там же, точка № 2	7 300,0	344,0	71,0	34,0	5,0	60,0	3,0	0
9	Высота около 1 700 м, горный чернозем	5 900,0	137,0	15,0	6,0	10,0	36,0	15,0	3,5
10	Там же, точка № 2	7 900,0	119,0	20,0	5,0	15,0	59,0	11,0	0,5
11	Там же, точка № 3	5 300,0	336,0	50,0	18,0	10,0	108,0	1,5	0,5
12	Высота около 1 100 м, каштановая почва	4 400,0	223,0	14,0	23,0	4,0	93,0	8,5	8,8
13	То же, образец № 2	5 200,0	235,0	12,0	12,0	3,8	103,0	7,3	20,0
14	То же, образец № 3	3 100,0	209,0	23,0	32,0	0	92,0	3,8	13,0
15	Высота около 900 м, бурая почва	12 600,0	239,0	трудно учесть	10,3	0	92,0	23,0	33,0
16	То же, образец № 2	7 300,0	220,0	18,0	0	0	73,0	40,0	19,0
17	То же, образец № 3	4 200,0	183,0	20,0	14,0	0	61,0	14,0	18,0

Примечание. Высота указана над уровнем моря.

состав данной группы микроорганизмов весьма точно отражает тип почвообразовательного процесса.

Бактериологический анализ почв был сделан в Ереване в лаборатории сектора микробиологии незамедлительно после их сбора. Так как почвы брались после начавшихся дождей, то они имели достаточную влажность.

Более полно нами были изучены почвы, взятые на вертикали горы Алагез, почему в настоящей работе мы ограничиваемся сообщением данных, полученных при их исследовании. Другие материалы лишь повторяют наблюдавшуюся здесь закономерность.

В табл. 1, характеризуя отдельные почвы, мы указываем общее число бактерий, учтенное посевом на МПА непастеризованной суспензии, а также общее число спор и видовой состав бациллярных форм. Последние учитывались в пастеризованном посеве (при 70° 10 минут) на агаризованную среду, состоящую на 50% из МПБ и на 50% из сусла (pH около 7,0).

В таблице мы приводим лишь выборочные данные, так как дополнительные материалы не дали бы ничего принципиально нового.

Таблица 1

в почвах горы Алагез (Арагац)

чах на 1 г почвы)

№ п/п	Характер исследованных почв	Общее число бактерий в непастер. посеве	Окультуренные почвы: Пастеризованный посев: Общее число спор	Bac. agglomeratus	Bac. cereus	Bac. mycoides	Bac. idosus	Bac. megatherium	Bac. mesentericus
9а	Высота ок. 1 700 м, посев пшеницы	7 800,0	291,0	34,0	4,5	10,0	148,0	50,0	6,0
10а	То же, посадка капусты . .	8 400,0	289,0	24,0	18,0	15,0	114,0	57,5	11,5
11а	То же, посадка картофеля . .	10 700,0	341,0	15,0	18,0	23,0	168,0	111,0	27,0
11б	То же, образец № 2	6 500,0	124,0	39,0	1,5	18,0	13,0	1,5	2,0
12а	То же, образец № 3	11 200,0	293,0	6,4	8,5	4,0	127,0	69,0	18,0
13а	Высота около 1 100 м, посадка картофеля	10 700,0	324,0	17,0	15,3	6,8	176,0	49,0	29,0
15а	Высота около 900 м, бурая под хлопчатником	7 700,0	313,0	23,0	0	0	101,0	53,0	56,0
16а	То же, под виноградником .	14 800,0	613,0	40,0	12,0	0	263,0	43,0	81,0
17а	То же, образец № 2	12 500,0	232,0	17,0	3,0	0	118,0	17,0	20,0

Переходя к рассмотрению фактического материала, остановимся прежде всего на высокогорных почвах, находящихся в зоне конечных морен ледника. Это рухляковые породы со слабо развитой и пятнами разбросанной растительностью, пребывающие в первых фазах почвообразовательного процесса. В этих почвах, могущих быть названными почвами лишь условно, мы находим относительно бедное бактериальное население. Непосредственно под дернинками растений оно сильно возрастает. Для данных почв характерна крайняя бедность бациллярными формами, что, как нами указывалось ранее, свойственно молодым, в частности северным почвам. Весьма типично также для бациллярного населения высокогорных почв явное преобладание спороносных бактерий из группы Bac. agglomeratus. Остальные формы здесь могут быть встречены в единичном числе. Нули, поставленные в таблице, показывают, что те или иные микроорганизмы не являются заметным компонентом в составе микробного ценоза. Единственные представители их здесь, конечно, могут быть обнаружены.

В почвах альпийских лугов заметно возрастает общая обсемененность бактериями. На 1 г почвы здесь приходится уже не менее 1 млн. бакте-

Примерное содержание бактерий на 1 г органи

№ п/п	Характер исследованных почв	Общее число бактерий на непастериз. посеве	Пастеризованный посев						
			Общее число спор	Bac. agglomeratus	Bac. cereus	Bac. mycoides	Bac. idosus	Bac. megatherium	Bac. mesentericus
	Целинные почвы								
1	Высота 4 000 м, неоформленная почва	3 000	120	100	0	0	0	0	0
2	Высота 3 600 м, слабо развитая почва	3 500	150	100	0	0	0	0	0
	Там же, под дерниной растений	70 000	200	110	20	0	0	0	0
3	Высота 3 200 м, почва альпийских лугов	12 000	1 100	1 000	50	0	30	0	0
4	Высота 2 100 м, горнолуговая почва	60 000	3 000	600	250	50	1 000	70	0
5	Высота ок. 1 700 м, горный чернозем	100 000	3 000	450	150	200	1 000	150	15
6	Высота 1 100 м, каштановая почва	120 000	6 500	500	700	70	3 000	180	400
7	Высота около 900 м, бурые почвы	300 000	8 000	около 800	300	0	3 000	900	1 000

Примечание. Нулевой показатель отмечает, что микроб заметно не представ

риальных клеток. Возрастает число бациллярных форм, но их состав остается по существу слабо измененным. Явно доминируют бактерии, близкие к Bac. agglomeratus, однако в заметных количествах начинают встречаться бактерии из группы Bac. cereus и отчасти Bac. idosus. В луговых почвах тундры мы наблюдаем картину, весьма близкую к только что описанной.

Значительно более богатой и разнообразной становится бактериальная флора на высоте около 2000 м в горно-луговых почвах. В составе неспороносных бактерий здесь в заметных количествах встречаются палочки, образующие на питательных средах желтоокрашенные колонии. В других почвах эти бактерии имеются, но их значительно меньше.

Видовой состав численно сильно возросших бациллярных форм делается разнообразнее. В заметном количестве обнаруживаются не только представители Bac. agglomeratus, но и Bac. idosus, причем последних микроорганизмов здесь имеется значительно больше, чем первых. В этих же почвах регулярно встречаются группы Bac. cereus и Bac. mycoides, а также Bac. megatherium.

В горных черноземах, взятых нами на высоте около 1700 м, наблюдается дальнейшее уменьшение бактерий группы Bac. agglomeratus и регулярно начинает встречаться Bac. mycoides

Окультуривание черноземов приводит к резкому увеличению числа клеток Bac. idosus и Bac. megatherium. Как мы указали в прошлой работе, последние две группы бактерий являются показателями более благополучного азотного режима почв. Они численно возрастают в почвах с более энергичной нитрификационной способностью. Это вполне понятно, так как Bac. idosus и Bac. megatherium значительно лучше усваивают минеральный азот, чем другие спороносные бактерии.

Из окультуренных черноземов выделяется по своим показателям

Таблица 2

ческого вещества различных почв в тысячах

№ п/п	Характер исследованных почв	Общее число бактерий на непастериз. почве	Пастеризованный посев						
			Общее число спор	Bac. agglomeratus	Bac. cereus	Bac. mycoides	Bac. idosus	Bac. megatherium	Bac. mesentericus
	Окультуренные почвы								
5а	Высота ок. 1 700 м, окультуренный горный чернозем .	120 000	3 700	300	150	250	1 600	800	180
6а	Высота ок. 1 100 м, каштановые окультуренные почвы	300 000	9 000	350	350	150	4 500	1 800	700
7а	Высота ок. 900 м, бурые окультуренные почвы . . .	500 000	17 000	900	200	0	6 500	1 600	2 000

лен в сообществе микроорганизмов.

лишь образец за № 11б. По составу микрофлоры он скорее напоминает неокультуренный горный чернозем. Причины данного явления мы установить не могли, так как история участка, с которого брался образец почвы, неизвестна.

В каштановых почвах общее количество бактерий и спороносных форм остается близким имеющимся в черноземных почвах. Однако несколько уменьшается обсемененность почвы бактериями группы Bac. agglomeratus и Bac. mycoides за счет возрастания зародышей Bac. idosus и Bac. mesentericus.

В зоне каштановых почв точно так же, как и в черноземах, окультуривание вызывает увеличение числа зародышей Bac. idosus и Bac. megatherium.

Переходим к бурым почвам, расположенным у основания Алагеза. В общем по составу спороносных форм бактерий они напоминают почвы каштанового типа, но здесь отмечается значительная редукция числа зародышей Bac. mycoides и известное снижение числа клеток Bac. cereus. В то же время некоторые бактериальные формы, как Bac. mesentericus и отчасти Bac. megatherium, продолжают нарастать.

Окультуренность в бурых почвах сказывается на составе спороносных бактерий так же, как и в других почвенных типах.

Таким образом, оценивая полученные результаты, мы видим, что каждый почвенный тип, занимающий определенное место по вертикали горы, характеризуется строго специфичным микробным ценозом. Здесь имеется полное повторение закономерности, установленной нами на почвах равнины Европейской части СССР, при постепенном движении с севера на юг.

Напомним, что В. Р. Вильямс рассматривал современные типы почв как выражение различных стадий единого почвообразовательного про-

цесса. В возрастном отношении почвы южной зоны являются более старыми и должны характеризоваться глубоко зашедшей трансформацией органического вещества.

В связи с этим происходит и соответствующая смена в составе микробного населения почвы, отчасти вскрываемая нами на примере спороносных бактерий.

Более детально наша точка зрения по затронутому вопросу была освещена в статье «Учение Докучаева — Вильямса о почве и вопрос о составе микроорганизмов в растительных формациях» [4], к которой мы и отсылаем читателя.

Отмечая вышеуказанную закономерность, мы должны вместе с тем сделать ряд оговорок во избежание неправильного понимания развиваемых положений. Прежде всего понятие «вертикальной зоны» в природе сильно осложняется теми или иными отклонениями в составе растительности. В настоящей статье на данном вопросе мы не предполагаем останавливаться более подробно, а вернемся к нему в особой работе.

Затем смену микробных ценозов мы иллюстрируем пока лишь на примере лучше изученных нами спороносных бактерий. В течение вегетационного периода данные микроорганизмы относительно мало меняются в числе и в видовом составе, что позволяет достаточно ответственные выводы делать на основании однократных исследований почвы. Тем не менее динамические наблюдения за микробиологическими процессами почвы совершенно необходимы и при первой возможности их следует организовать.

Полученный нами материал заставляет думать, что различные почвы достаточно заметно отличаются и по составу ассоциаций других микроорганизмов. Однако сколько-нибудь категорические заключения по данному поводу делать преждевременно. Следует учесть, что неспороносные бактерии, актиномицеты и грибы показывают значительную динамику за вегетационный период и ее необходимо уточнить.

Мы вполне разделяем точку зрения Н. М. Лазарева [4] о том, что при характеристике биогенности почвы неправильно делать расчеты числа микроорганизмов на единицу веса. На самом деле сапрофитные бактерии, например, размножаются лишь на органическом веществе почвы, и поэтому для нас интересно получить представление о его заселенности микроорганизмами [1]. Примерные подсчеты подобного рода нами произведены в табл. 2 и 3. В первой из них даны округленные цифры, вычисленные на 1 г органического вещества почвы, во второй показано процентное соотношение отдельных групп спорообразующих бактерий, вычисленное на основании цифр табл. 2. Еще раз подчеркиваем, что приводимые материалы имеют сугубо ориентировочное значение.

Как можно легко установить, по мере снижения к основанию горы отмечается значительное увеличение общего числа бактерий и спорообразующих форм в органическом веществе почвы. Одновременно делается все более и более богатым видовой состав бактерий, образующих споры. Так, на высоте 3500—4000 м основная масса бациллярных форм представлена Bac. agglomeratus. В почвах, залегающих на высоте около 2000 м, довольно часто встречается Bac. idosus, Bac. mycoides, Bac. cereus, Bac. agglomeratus. К основанию горы из ценоза бациллярных форм исчезает Bac. mycoides, но появляется новый компонент — Bac. mesentericus. Окультуривание почв, как правило, особенно сильно увеличивает в почве содержание Bac. megatherium и Bac.

[1] Лазарев предлагает делать пересчеты на валовой азот почвы, считая его показателем, характерным для типа почвы.

Мы перечисляем число бактерий на 1 г органического вещества.

Таблица 3

Процентное соотношение отдельных групп спороносных бактерий в различных почвах

№ п/п	Исследованные почвы	Bac. agglomeratus	Bac. cereus	Bac. mycoides	Bac. idosus	Bac. megatherium	Bac. mesentericus	Прочие бактерии
	Целинные почвы							
1	Высота 4 000 м, неоформленная почва	83	0	0	0	0	0	17
2	Высота 3 600 м, слабо развитая почва	66	0	0	0	0	0	34
	Там же, под дерниной растений	55	10	0	0	0	0	35
3	Высота 3 200 м, почва альпийских лугов	90	5	0	3	0	0	2
4	Высота 2 000 м, горно-луговая почва	20	8	1,5	33	2	0	25,5
5	Высота ок. 1 700 м, горный чернозем	15	5	7	33	5	1,15	34,8
6	Высота ок. 1 100 м, каштановые почвы	8	11	1	46	3	6	26
7	Высота ок. 900 м, бурые почвы	10	4	0	37	11	13	15
	Окультуренные почвы							
5а	Высота ок. 1 700 м, окультуренные горные черноземы	8	4	6	43	21,5	5	11,5
6а	Высота ок. 1 100 м, окультуренные каштановые почвы	4	4	1,7	50	20	8	12,3
7а	Высота ок. 900 м, окультуренные бурые почвы	5	1	0	38	10	12	36

Примечание. В таблице цифры даны в округленном выражении.

mesentericus. Деталей данных сдвигов мы не разбираем, так как они понятны из приведенных материалов.

В заключение мы считаем небходимым остановиться на отмеченной нами смене экотипов Bac. mycoides в исследованных почвах. В монографии «Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий» [6] нами был описан ряд вариантов Bac. mycoides и отмечено, что их распространение связано с определенными типами почв. Представлялось интересным проследить, происходит ли смена экотипов Bac. mycoides в почвах Армении. Для решения этой задачи при производстве микробиологических анализов была собрана коллекция около 120 культур Bac. mycoides, тип которых был определен с помощью выращивания этих культур на рекомендованной нами пептонной среде.

Таблица 4

Типы Bac. mycoides, встречающиеся в разных почвах горы Алагез

№ п/п	Тип почвы	Количество выделенных культур	Из них относятся к следующим типам				
			1a	1a — 1c	1c	2a	2b
1	Почвы высокогорных лугов	22	4	0	0	11	7
2	Горные черноземы	42	3	2	4	24	9
3	Каштановая почва	24	5	1	6	9	3
4	Бурые почвы	29	6	3	20	0	0

Процентное соотношение основных типов Bac. mycoides

1	Почвы высокогорных лугов	17	83
2	Горные черноземы	21	79
3	Каштановая почва	50	50
4	Бурые почвы	100	0

Как показывают данные табл. 4, результат получился вполне определенный. В буроземах доминирующим оказался тип 1c,[2] а вообще варианты типа 1a — 1c составляли 100% от всех проанализированных культур. В черноземных почвах, наоборот, совершенно явно преобладали формы Bac. mycoides типа 2a и 2b, составляя 79%. Каштановые почвы занимали промежуточное положение.

Таким образом, на примере почв Армении с очевидностью подтверждается локализация экотипов Bac. mycoides в определенных почвах.

При проведении настоящей работы, помимо авторов, участвовали Е. П. Громыко, В. К. Мишустина и Р. Арутюнян.

Выводы

1. Ранее описанная одним из авторов настоящей работы зависимость между составом растительных формаций, населяющих равнину Европейской части СССР, и составом спорообразующих бактерий почвы находят свое проявление и при анализе почв различных растительных поясов горных мест.

2. Установлена вполне рельефно выраженная смена ранее изученных экологических типов Bac. mycoides в различных типах почв.

[2] Описание типов Bac. mycoides дано нами в работе «Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий» [5].

3. Окультуривание почв вызывает вполне заметную перегруппировку в составе бациллярного населения почвы.

4. Факты, отмеченные выше, подтверждают заключение, что состав бациллярных форм почвы может быть использован для характеристики типа и состояния почвы.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 15.XI.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильямс В. Р. Почвоведение. Сельхозгиз, 1947.
2. Докучаев В. В. Русский чернозем. Сельхозгиз, 1948.
3. Костычев П. А. Почвы черноземной области России. СПб., 1886.
4. Лазарев Н. М. Типы биограноминеральных систем различных почв. Труды Всесоюзного научно-иссл. ин-та с.-х. микробиологии за 1941—1945 гг., стр. 23, 1949.
5. Мишустин Е. Н. Учение Докучаева — Костычева — Вильямса о почве и вопрос о составе микроорганизмов в растительных формациях. Микробиология, XIX (1), 11, 1950.
6. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных микроорганизмов. Изд. АН СССР, 1947.

БАКТЕРИИ, МИНЕРАЛИЗУЮЩИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ФОСФОРА

Р. А. Менкина

Среди разнообразных процессов, развивающихся в почве и обусловливающих ее плодородие, существенное значение имеет процесс биологического превращения фосфора.

Как уже сообщалось [6, 9], изучение биологической трансформации фосфора в почве было начато в Институте сельскохозяйственной микробиологии под руководством Рудакова в 1935 г. В литературе этот вопрос достаточного освещения пока не получил, хотя и затрагивался целым рядом авторов. Еще в 1890 г. П. А. Костычев [4] высказал предположение, что фосфор в почве подвергается превращениям под влиянием микробиологических процессов. Позднее Stoklasa [12], Perotti [11], Северин [10], Базаревский [1] установили, что почвенные микроорганизмы обладают способностью в результате своей жизнедеятельности растворять трехкальциевый фосфат фосфоритовой и костяной муки. Базаревским был выделен целый ряд бактерий, способствующих растворению труднорастворимых минеральных фосфатов. Аналогичные результаты приводятся в недавно появившейся статье Пиковской [8].

Основными задачами наших исследований явилось изучение процесса минерализации фосфора органических соединений и мобилизация его в легкоусвояемые формы, выявление возбудителей этого процесса и установление их значения в почве.

Мобилизация фосфора органических соединений почвы является чрезвычайно важным вследствие того, что основное количество фосфора в почве связано с органическим веществом и недоступно для усвоения растениями. П. А. Костычев полагал, что даже в подзолах фосфор находится большей частью в виде органических соединений. В почве различают: 1) собственно органический фосфор, являющийся неотъемлемой частью белковой молекулы (это — фосфор растительных и животных остатков, микро- и макронаселения почвы), и 2) фосфор, закрепленный в почве и входящий в состав гумуса через связь с полуторными окислами [3]. Эти формы фосфора непосредственно, без предварительной минерализации, не могут быть использованы растениями. Роль их в общем балансе фосфора в почве громадна. В связи с этим поставленные нами для исследования задачи имеют весьма важное значение.

В настоящей статье изложены результаты первой части наших исследований, а именно: 1) результаты по выявлению и выделению бактерий, осуществляющих процесс освобождения фосфора из органических соединений; 2) морфолого-физиологическая характеристика отдельных представителей этой группы бактерий; 3) значение этих бактерий в использовании растениями P_2O_5 из органических фосфорсодержащих соединений.

Выделение чистых культур бактерий на средах с органофосфатами

Для выявления бактерий, обладающих способностью минерализовать сложные фосфорорганические соединения, была применена методика элективных сред, где в качестве единственного источника фосфор-

ного питания были использованы чистые препараты органических соединений, содержащих фосфор,— лецитин и нуклеиновая кислота. Учитывая, что почвенные бактерии лучше развиваются на плотных средах, для выделения указанных выше бактерий из различных почв были использованы пластинки Виноградского из кремнекислого геля. Гелевые пластинки пропитывались 3—5 мл питательного раствора следующего состава:

Вода	1000 мл	$FeSO_4$	Следы
$(NH_4)_2SO_4$ . .	0,5 г	$MnSO_4$	„
NaCl	0,3 „	Глюкоза	10,0 г
KCl	0,3 „	$CaCO_3$	5,0 „
$MgSO_4$	0,3 „		

Лецитин или нуклеиновая кислота вносились из расчета 5 мг P_2O_5 на пластинку. Лецитин предварительно растворялся в 96° этиловом спирте. Среда испытывалась также и в других вариантах: с мелом и без мела — для подбора благоприятной реакции с маннитом, с глюкозой и без них для выявления дополнительного источника углеродистого питания. Приготовленные пластинки стерилизовались в автоклаве при $^1/_2$—$^3/_4$ атм 20 минут. Для отвивки бактерий из колоний и получения чистых культур применялась вышеуказанная среда с прибавлением агар-агара. Фосфор в виде лецитина или нуклеиновой кислоты вносился в каждую пробирку из расчета 3—5 мг P_2O_5. Среда стерилизовалась при $^3/_4$—1 атм 20 минут. Следует отметить, что использование нуклеиновокислого натрия вместо нуклеиновой кислоты менее пригодно, так как натриевая соль нуклеиновой кислоты при стерилизации дает заметное отщепление фосфора и среда вследствие этого становится неэлективной. Гелевые пластинки заражались мельчайшими крупинками почвы. Посевы были сделаны из трех различных почвенных образцов: 1) чернозема, взятого из заповедника Каменностепной опытной станции, с pH почвы, равным 6,9; 2) низинного торфа Минской болотной сельскохозяйственной опытной станции с pH, равным 6,0; 3) слабоподзолистой почвы Ленинградской области с pH, равным 6,0. Применение элективных сред с различным значением pH (от 5,0 до 7,0) позволило из всех трех почвенных разностей при 27° и 34° выявить и выделить ряд активных бактерий. Эти бактерии были выделены преимущественно на средах со значением pH, равным 7,0—7,5, которые в дальнейшем и оказались наилучшими для их развития. На элективных пластинках при засеве их почвой появлялись единичные слизистые, тягучие колонии. При микроскопировании материала из таких молодых колоний обнаруживались однотипные крупные палочки, впоследствии, как оказалось, споровые. Такие палочки были выделены из всех трех почв, взятых для исследования. Из подзола на пластинках с лецитином колонии были несколько иные, тоже слизистые, но не тягучие. При микроскопировании этих колоний была обнаружена мелкая бесспоровая палочка. Путем отвивок из молодых колоний на элективные агаровые среды легко были выделены чистые культуры этих бактерий.

По морфологическим и культуральным признакам все споровые палочки, выделенные из различных почв и обозначенные культурами N 2, 6, 7, характеризуются следующими признаками.

1. Все они — крупные палочки с закругленными концами, толстой оболочкой и зернистой протоплазмой. При дальнейшем развитии концы клеток заостряются и клетки принимают форму конуса. В очень ранней стадии развития клетки расположены одиночно и слабо подвижны, в дальнейшем клетки становятся неподвижными и располагаются попарно и короткими цепочками. Размеры клеток варьируют в пределах 2,5—4—6 $\mu \times 1{,}8$ μ. Клетки содержат волютин, образуют овальные эндоспоры размером 1,2 $\mu \times 0{,}7$ μ, расположенные субтерминально. Окрашиваются по Граму (рис. 1).

2. Аэробы. Дают хороший рост по штриху на ряде питательных сред: элективной агаровой среде с органическими соединениями фосфора, мясопептонном агаре с глицерином и без него, сусло-агаре, картофеле. Оптимальная температура роста 37°.

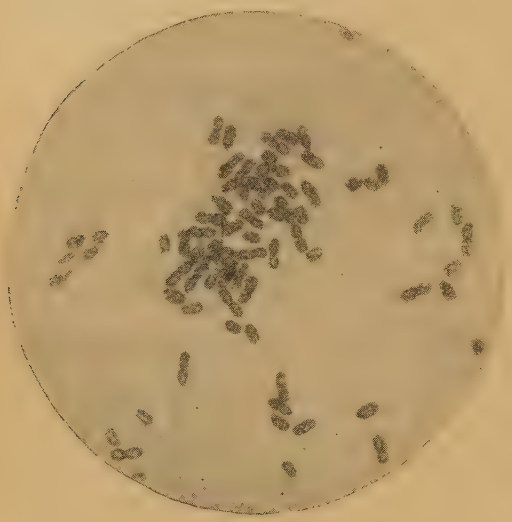


Рис. 1. Бактерии, минерализующие органические соединения фосфора (споровые палочки) Ув. 600 в раз

3. На мясопептонной желатине колонии круглые, слизистые, желтовато-белые. При посеве уколом рост в виде гвоздя, разжижение на 2—3-и сутки, воронкообразное, переходящее в послойное.

4. В мясопептоном бульоне, с добавлением глюкозы и без нее, небольшой осадок буроватого цвета, на стенках пробирки кольцо, мути нет; NH_3, H_2S и индол не обнаруживается.

5. В молоке с лакмусом активная пептонизация, сильное подкисление и покраснение всей среды.

6. На синтетической среде с глюкозой, сахарозой, галактозой, мальтозой, лактозой и маннитом — кислотообразование; газообразование не обнаруживается.

7. На синтетической среде с добавлением $(NH_4)_2SO_4$ аспарагина, гликоколя и пептона дают хорошее развитие, с добавлением KNO_3 развитие слабое. Редуцируют нитраты.

8. На картофеле грязновато-белый, переходящий в бурый цвет слизистый налет.

9. На мясопептонном агаре и элективной агаровой среде с фосфорорганическими соединениями образуются грязновато-белые, резко окаймленные колонии. Старые колонии буреют, также буреет и сам МПА. Элективная среда при культивировании этих бактерий цвета не изменяет. На элективной среде в присутствии мела вокруг колоний образуются светлые зоны в результате подкисления среды и растворения мела (рис. 2).

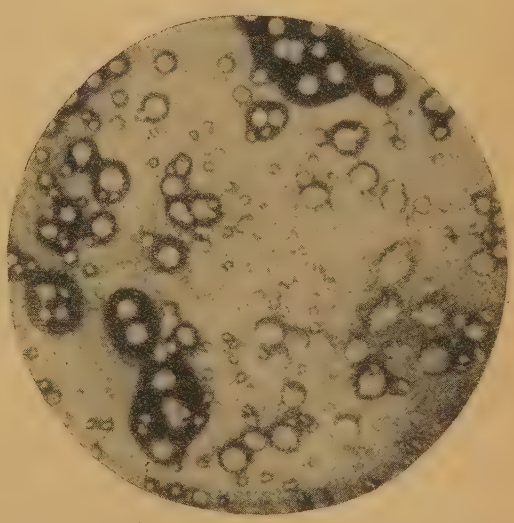


Рис. 2. Рост колоний на элективной среде (споровая палочка). Зоны — растворение $CaCO_3$

Помимо споровых палочек, как уже указывалось выше, из подзолистой почвы на элективной среде с лецитином была выделена другая — бесспоровая палочка, обозначенная культурой К. Морфолого-культуральные признаки этой культуры следующие:

1. Мелкие, размером 1,8—2 $\mu \times 0{,}5$—$0{,}7$ μ, бесспоровые палочки с за-

кругленными концами, расположенные одиночно или попарно. По Граму не красятся.

2. Факультативные аэробы. Образуют хороший рост по штриху на элективной агаровой среде с фосфорорганическими соединениями, на МПА с глицерином и без него. Рост по штриху блестящий с розовым пигментом. Оптимальная температура 27°.

3. На картофеле растут слабо.

4. На мясопептонной желатине колонии круглые, мелкие, слизистые с розовым пигментом, при посеве уколом рост в виде гвоздя, желатины не разжижают.

5. В мясопептонном бульоне с добавлением глюкозы и без нее — очень слабая муть, на дне бледнорозовый осадок, на поверхности кольцо.

6. В молоке с лакмусом — пептонизация, подщелачивание.

7. На синтетической среде газообразование не обнаруживается.

8. На синтетической среде с добавлением $(NH_4)_2SO_4$ аспарагина, гликоколя и пептона дают хорошее развитие, с добавлением KNO_3 в виде источника азота, рост слабый. Редуцируют нитраты.

9. На МПА и элективной агаровой среде с фосфорорганическими соединениями выпуклые, круглые, блестящие колонии бледнорозового цвета. В отличие от культур споровой группы, они не образуют светлых зон вокруг колоний на среде с фосфорорганическими соединениями и мел не растворяют.

10. Расщепляют жиры — трибутирин и растительное масло.

Из этого описания видно, что культура К, отличающаяся по морфологическим свойствам, отлична от споровых палочек также и рядом физиологических свойств.

Наиболее интересным и характерным отличием культур, как это будет видно из дальнейшего, является их отношение к различным источникам органических соединений фосфора.

Определение систематического положения бактерий, выделенных на элективной среде, на основе общих морфолого-культуральных свойств показало близость выделенной группы споровых палочек к Bac. megatherium. Однако исследование штаммов Bac. megatherium, хранящихся в Музее живых культур Института, обнаружило их неспособность к активной минерализации фосфорорганических соединений. Поэтому можно предполагать, что выделенные нами культуры являются вариантами Bac. megatherium со стойкой способностью к разложению органических соединений фосфора. На этом основании эти культуры обозначаются нами Bac. megatherium var. phosphaticum.

Определение систематического положения неспоровой палочки, культуры К, показано, что по ряду культуральных признаков эта культура идентифицируется с Serratia corallina по определителю Бердже [2]. Однако имеются отклонения от этого вида. Определить точное положение этой культуры в классификации микроорганизмов не удалось также при пользовании определителем Красильникова [5]. Поэтому видовое определение культуры К будет дано в следующем сообщении. Условно мы эту культуру обозначаем как Serratia var. phosphaticum.

Минерализация лецитина и нуклеиновой кислоты чистыми культурами бактерий, выделенными из почвы

Следующей нашей задачей явилось изучение активности полученных нами культур по энергии минерализации органических соединений, содержащих фосфор. При культивировании этих бактерий на элективной среде с фосфорорганическими соединениями было установлено появление в среде значительных количеств подвижных солей фосфорной кислоты. Для выявления степени минерализации органических соединений

фосфора и количественного определения освобождаемой фосфорной кислоты агаровая среда оказалась непригодной. Несмотря на тщательное вымывание фосфорной кислоты (путем механической обработки агара крупнозернистым песком и последующего центрифугирования и фильтрования), значительная ее часть оставалась адсорбированной агаром. Опыты по выявлению степени поглощаемости фосфорной кислоты агаром при внесении определенных количеств P_2O_5 фосфорнокислого калия в среду и обратного его вымывания показали, что от 13 до 38% внесенной P_2O_5 поглощается агаровой средой [1]. Чем больше фосфорной кислоты вносилось в агаровую среду, тем сильнее была степень адсорбции P_2O_5. В связи с этим для определения степени минерализации фосфорорганических соединений различными культурами опыты проводились в стерильном песке. Для исследований были взяты споровые культуры № 2 и № 6, выделенные из чернозема, № 7, выделенная из торфа, и бесспоровая палочка — культура К, выделенная из подзолистой почвы Ленинградской области.

В эрленмейеровские колбочки емкостью 250 мл вносилось 75 г песка, предварительно прокаленного и промытого соляной кислотой и водой до полного исчезновения следов HCl. Песок увлажнялся вышеуказанной питательной средой до 50—60% от полной влагоемкости. В качестве источника фосфора в каждую колбу отдельно вносились органические соединения фосфора — лецитин или нуклеиновая кислота из расчета 5 мг P_2O_5 на колбу. После этого колбы стерилизовались и заражались чистыми культурами бактерий. Опыты длились от трех до четырех недель при 27° и 34°. После инкубации в термостате в каждой колбочке определялось количество P_2O_5, образовавшейся в результате минерализации лецитина, нуклеиновой кислоты и нуклеина.

Фосфорная кислота извлекалась из песчаной культуры полностью путем вымывания 0,05 *N* HCl при многократной декантации и определялась колориметрически по методу Дениже в модификации Пестова [6].

Данные табл. 1 и 2 показывают активность выделенных культур, а также их отношение к лецитину, нуклеиновой кислоте и нуклеину, как источникам P_2O_5.

Культуры № 2, 6, 7, близкие друг к другу по морфологическим и физиологическим свойствам, оказались также одинаковыми по их минерализующей способности и отношению их к формам органических соединений фосфора. Все они активно минерализовали нуклеиновую кислоту и нуклеин с накоплением в среде до 74—86% P_2O_5 от исходного количества в этих соединениях, тогда как в опыте с лецитином накопление P_2O_5 достигало только 17—50%, причем энергичнее всего (50%) в опыте с культурой № 2. Культура К, неспоровая палочка, энергичнее минерализовала лецитин. Накопление фосфорной кислоты в опытах с этой культурой на лецитине достигало 50—52%, тогда как с нуклеиновой кислотой накопление фосфорной кислоты не превышало 21%. Среди споровых культур особого внимания заслуживает культура № 2 с относительно высокой активностью минерализации обеих форм фосфорорганических соединений — нуклеиновой кислоты, 81% P_2O_5, лецитина 50%. В тесной связи с более активной минерализацией лецитина, относящегося к группе липоидов, стоит активное расщепление этой культурой жиров. Культура К также активно расщепляет жиры. Одинаковое отношение культур № 2 и К к жирам находится в полном соответствии с одинаковым активным отношением этих бактерий к лецитину, хотя по морфологическим признакам и многим физиологическим свойствам они различны. Культура № 2, споровая палочка, подкисляет, а культура К, бесспоровая палочка, подщелачивает одни и те же питательные среды. Являясь активными минерализаторами лецитина, имею-

[1] Анализы проведены Ф. Ф. Соколовым.

щего в своем составе глицерофосфат, они также активно расщепляют жирь: трибутирин и растительное масло.

Другие выделенные бактерии слабо расщепляют лецитин и вовсе не расщепляют жиров. Различное отношение выделенных культур к разным формам фосфорорганических соединений несомненно указывает на то, что они обладают различными ферментами. Культура № 2 обладает, повидимому, более разнообразным комплексом этих ферментов.

Таблица 1

Минерализация лецитина и нуклеиновой кислоты чистыми культурами бактерий, выделенных из почвы

Опыт в песке, длительность опыта 21 день

Вариант опыта	Количество P_2O_5 с лецитином					Количество P_2O_5 с нуклеиновой кислотой				
	исходное	минерализовано				исходное	минерализовано			
		в отсутствие глюкозы		с глюкозой			в отсутствие глюкозы		с глюкозой	
		мг	%	мг	%		мг	%	мг	%
Контроль	5	0	0	0	0	5	Следы	—	Следы	—
Споровая культура № 2	5	2,33	46	2,50	50	5	4,06	81	4,07	81
Споровая культура № 6	5	1,57	31	1,59	31	5	4,06	81	4,01	80
Споровая культура № 7	5	0,81	16	0,84	17	5	3,30	66	4,30	86
Неспоровая культура К	5	2,65	52	2,50	50	5	1,10	21	1,14	22

Таблица 2

Влияние дополнительного источника азота на процесс минерализации

Длительность опыта 21 день

Вариант опыта	Количество P_2O_5 с лецитином					Количество P_2O_5 с нуклеиновой кислотой					Количество P_2O_5 с нуклеином				
	исходное	минерализовано				исходное	минерализовано				исходное	минерализовано			
		с сернокислым аммонием		без сернокислого аммония			с сернокислым аммонием		без сернокислого аммония			с сернокислым аммонием		без сернокислого аммония	
		мг	%	мг	%		мг	%	мг	%		мг	%	мг	%
Контроль	5,30	0	—	0	—	5,08	Следы	—	Следы	—	5,00	0,22	44	0,22	4,4
Внесена культура № 2	5,30	2,68	50	2,64	49	5,08	4,10	80	3,70	72	—	—	—	—	—
Внесена культура № 7	5,30	1,28	24	1,46	28	5,08	4,14	81	3,57	70	5,00	3,09	62	3,46	70
Внесена культура К	5,30	2,53	48	2,43	47	5,08	1,15	21	0,75	14	5,00	1,17	23	1,16	22

Выявление значения дополнительного источника энергетического вещества для жизнедеятельности бактерий показало, что внесение в среду маннита или глюкозы вызывало более энергичную минерализацию только в случае заражения среды споровой культурой № 7. В остальных случаях дополнительное внесение энергетического материала не повы-

сило энергии минерализации, что указывает на использование этими бактериями фосфорорганических соединений как источника энергии. Внесение дополнительного источника азота на энергии минерализации отразилось по-разному, в зависимости от формы фосфорорганического соединения. Так, дополнительное внесение азота в виде $(NH_4)_2SO_4$ в опыте с лецитином мало изменяет степень накопления P_2O_5. Внесение $(NH_4)_2SO_4$ в опыте с нуклеиновой кислотой (табл. 2) значительно усиливает минерализацию. В присутствии нуклеина, содержащего в своем составе более значительное количество азота, добавление минерального азота влияния не оказывает.

Отношение культур к нуклеину как источнику P_2O_5 такое же, как и их отношение к нуклеиновой кислоте. В контрольных незараженных колбочках с лецитином минеральные формы фосфора совершенно отсутствовали, с нуклеиновой кислотой имелись следы, с нуклеином имелось до 4% P_2O_5, отщепляющихся при стерилизации.

Определенная специфичность выявленных нами бактерий в отношении энергии минерализации — лецитина и нуклеиновой кислоты — заставляет думать, что процесс разложения сложных соединений фосфора в почве, где наряду с указанными формами фосфорорганических соединений имеются и другие трудномобилизуемые соединения фосфора, не ограничивается только двумя выделенными видами бактерий и что в природе этот процесс, очевидно, может итти за счет более широкой группы микроорганизмов.

Значение бактерий в использовании растениями фосфора органических соединений

Для выяснения вопроса о значении выявленных нами бактерий в использовании растениями P_2O_5 фосфорорганических соединений были поставлены специальные опыты по выращиванию гречихи в стерильных песчаных культурах. Предварительно прокаленный и промытый соляной кислотой и затем водой до исчезновения HCl песок пропитывался питательным раствором. Прянишникова, из которого были исключены фосфорнокислые соли. Вместо фосфата кальция в качестве источника фосфорного питания вносились органические его соединения — лецитин или нуклеиновая кислота из расчета 213 мг P_2O_5 на сосуд. В песок вносился также мел до pH, равного 6,8—7,0. После стерилизации определенным способом смонтированных для опытов сосудов они засевались стерильными семенами гречихи. Часть сосудов была заражена чистыми культурами бактерий, минерализующих органические соединения фосфора; другая часть, незараженная, служила контролем. Опыты были поставлены в десятикратной повторности. Наблюдения показали, что вскоре после появления всходов растения в контрольных сосудах стали отставать в росте. До конца вегетации они оставались мелкими, мало развившимися, с желтыми листочками и буро-красным стеблем. Растения в зараженных сосудах развивались нормально, цвели и плодоносили. Особенно яркое различие в росте было главным образом в сосудах с лецитином. В опытах с нуклеиновой кислотой в связи с тем, что при ее стерилизации отщепляется некоторое количество P_2O_5, разница между контрольными сосудами и сосудами, зараженными бактериями, была менее резкой. При произведенной нами двойной стерилизации сосудов количество отщепленной P_2O_5 в сосудах с нуклеиновой кислотой достигало 30 мг на сосуд, т. е. составляло такое количество, которое могло обеспечить хорошее развитие растений. В табл. 3 представлены данные урожая этих опытов и содержания фосфора в растениях.

Как показывают эти данные, растения не способны использовать фосфор органических соединений. В опыте с лецитином в контрольных

сосудах малый вес сухой массы находится в соответствии с чахлым состоянием растений. При весе растений в среднем 0,45 г из контрольных сосудов содержание фосфора в растении составляло 0,86 мг. В сосудах, в которые были внесены бактерии, минерализующие фосфорорганиче-

Таблица 3

Влияние бактерий, минерализующих органические соединения фосфора, на фосфорное питание растений

Стерильный вегетационный опыт

Вариант	Источник фосфора — лецитин					Источник фосфора — нуклеиновая кислота				
	вес сухой массы растений		вес зерна		содержание фосфора в растениях в мг	вес сухой массы растений		вес зерна		содержание фосфора в растениях в мг
	в г	в %	в г	в %		в г	в %	в г	в %	
Контроль	0,45	100	0,085	100	0,86	5,12	100	2,60	100	28,75
Внесена культура № 2	1,60	355	0,80	941	10,49	8,30	162	4,28	165	50,25
Внесена культура К	1,54	342	0,64	753	9,85	7,54	148	3,54	136	46,84

ские соединения, вес сухой растительной массы значительно больший при нормальном образовании семян. При весе сухой массы по культуре № 2 (споровой) в среднем 1,6 г содержание фосфора в растениях составляло 10,49 мг. По культуре К (бесспоровой) при массе, равной 1,54 г, содержание фосфора в растениях составляло 9,85 мг. В опыте с нуклеиновой кислотой благодаря значительному отщеплению P_2O_5 при стерилизации вес сухой массы растений был выше, чем в опыте с лецитином. В среднем в контрольных сосудах сухая масса растений равнялась 5,12 г, содержание фосфора в растениях составляло то количество, которое было отщеплено при стерилизации (28,7 мг). В бактеризованных сосудах масса растений значительно выше: по культуре № 2 она составляет 8,30 г с содержанием фосфора 50,25 мг. По культуре К сухой вес растений равен 7,54 г с содержанием фосфора 46,84 мг. Таким образом, и здесь растения не могли использовать фосфор нуклеиновой кислоты без предварительной минерализации.

Испытываемые бактерии, являясь активными минерализаторами органических соединений фосфора, оказались способными обеспечить фосфором не только свое собственное питание и развитие, но и фосфорное питание высшего растения. Полученные результаты указывают, таким образом, на важную роль этих бактерий в расщеплении сложных органических соединений фосфора и в мобилизации доступной растениям фосфорной кислоты. Проведенные исследования позволили нам подойти к изучению роли этих микроорганизмов в процессе минерализации фосфорорганических соединений почвы. Многолетние и массовые опыты по внесению этих бактерий в почвы под сельскохозяйственные растения как в виде чистой культуры этих бактерий, так и в виде бактериального препарата, названного фосфоробактерином, показывают повышение урожая зерновых культур вследствие улучшения их фосфорного питания. Сообщение о результатах этих исследований явится материалом следующей статьи.

Выводы

1. Применение элективной питательной среды, содержащей в качестве единственного источника фосфора органические его соединения — лецитин или нуклеиновую кислоту, позволило выявить бактерии, активно минерализующие эти формы фосфорорганических соединений.

2. Выделенные бактерии по морфологическим признакам представлены двумя группами, по физиологическим — тремя:

а) споровые палочки, подкисляющие питательную среду, энергично минерализуют нуклеиновые соединения и обладают слабой активностью в отношении минерализации лецитина;

б) споровые палочки (культура № 2), подкисляющие питательную среду, энергично минерализуют нуклеиновые соединения и в значительной степени энергично минерализуют лецитин;

в) бесспоровые палочки, подщелачивающие среду, энергично минерализуют лецитин и слабо разлагают нуклеиновые соединения.

3. Опыты по выращиванию растений в стерильных песчаных культурах, где единственным источником фосфорного питания служили фосфорорганические соединения — лецитин или нуклеиновая кислота, показали, что внесение изучаемых нами бактерий обеспечивает нормальное развитие растений в результате минерализации фосфорорганических соединений и освобождения фосфорной кислоты.

Всесоюзный институт
сельскохозяйственной микробиологии
Ленинград

Получено 25.V.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Базаревский С. Д. К вопросу о мобилизации фосфорной кислоты в почве под влиянием деятельности микробов. Монография. Москва, 1916.
2. Берджe Д. Определитель микробов. Изд. Акад. Наук УССР, Киев, 1936.
3. Карпинский Н. П. и Замятина В. Б. Фосфорная кислота, связанная с с органическим веществом почвы. Тр. Всесоюз. научно-исслед. ин-та удобрения и агропочвоведения, вып. 2, 1933, стр. 133.
4. Костычев П. А. О некоторых свойствах и составе перегноя. Сельское хозяйство и лесоводство. СПб., стр. 115, 1890.
5. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. Акад. Наук СССР, Москва — Ленинград, 1949.
6. Менкина Р. А. Минерализация органических фосфатов, как одно из условий окультуривания заболоченных почв. Применение удобрений на болотных почвах. Под редакцией академика О. К. Кедрова-Зихман, И. З. Станкова. ВАСХНИЛ, Сельхозгиз, Москва, 1940, стр. 27.
7. Пестов Н. Е. Колориметрическое определение фосфорной кислоты. Тр. Научного ин-та по удобрениям им. Самойлова, вып. 87, 1937.
8. Пиковская Д. И. Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов. Микробиология, XVII, вып. 5, стр. 362, 1948.
9. Рудаков К. И. О роли микроорганизмов в круговороте фосфора, Природа, № 3, 1936.
10. Северин С. Мобилизация почвенной фосфорной кислоты под влиянием жизнедеятельности бактерий. Вестник бактериолого-агрономической станции № 17, стр. 100, 1910, № 18, стр. 156 1911.
11. Perotti R. Über den biochemischen Kreislauf der phosphorsäure im Ackerboden. Ctbl. Bakt., II, 25, 409, 1909.
12. Stoklasa J. Biochemischer Kreuslauf der Phosphat Ions im Boden. Ctbl. f. Bakt., II, 29, 385, 1911.

ПОЧВЕННАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩАЯ МИКОХИТРИДИЯ RHIZOPHLYCTIS ROSEA

Д. М. Новогрудский и *З. Ф. Теплякова*

Разрушение органических остатков и образование почвенного гумуса представляют важнейший почвообразовательный процесс. Помимо бактерий, актиномицетов и высших грибов (гифомицетов), в разрушении поступающих в почву растительных и животных остатков принимают активное участие микохитридиевые грибы. В последние годы различными авторами описаны новые сапрофитные почвенные микохитридии, развивающиеся на клетчатке [4, 8], кератине [8], хитине [7]. Слабой стороной этих исследований является то, что они производились в культурах, содержащих посторонние бактерии. Поэтому физиология описанных микохитридий остается неясной и невозможно решить, действительно ли они усваивают клетчатку, кератин, хитин или развиваются за счет продуктов, образуемых сопутствующими бактериями.

В настоящей статье излагаются исследования по экологии и физиологии распространенной в почвах сапрофитной целлюлозоразрушающей микохитридии Rhizophlyctis rosea (De-Bary u. Woronin) A. Fischer, проведенные в условиях абсолютно чистых культур.

Исходные и накопительные культуры

Rhizophlyctis rosea часто выделяется из различных почв Казахской ССР при посеве почвенных комочков на агарово-минеральные пластинки среди Хетчинсона [1] или кремнекислые пластинки, пропитанные раствором Омелянского [2], покрытые кружочками фильтровальной бумаги. При развитии ризофликтиса бумага вокруг почвенных комочков окрашивается в розовый цвет и энергично разрушается. Микроскопирование волокон бумаги из области розовых пятен показывает наличие огромного множества крупных (от 15 до 80 μ) зооспорангиев ризофликтиса с оранжевым или розовым содержимым. Одновременно в разрушающейся бумаге находят приют различные бактерии и протозоа.

Пересевы с края окрашенных пятен на свежие питательные среды приводили через 4—5 суток (при 28°) к образованию розовоокрашенных пятен и глубокому распаду бумаги с тем же комплексом микроорганизмов из ризофликтиса, бактерий и протозоа.

Дальнейшие пересевы производились в пробирки с 5 см³ раствора Хетчинсона и погруженными в него полосками фильтровальной бумаги или целлофана. В таких пробирочных культурах ризофликтис сначала окрашивает бумагу непосредственно над жидкостью; со временем розовая окраска переходит все выше, а на старых участках она исчезает и бумага полностью просветляется. Вследствие разрыва бумаги на

[1] Дестиллированной воды — 1000 мл; фосфорнокислого калия (двухзамещенного) — 1,0 г; хлористого кальция — 0,1 г; сернокислого магния — 0,3 г; хлористого натрия — 0,1 г; хлористого железа —0,01 г; азотнокислотного натрия —2,5 г; агар-агара —10,0 г.

[2] Дестиллированной воды — 1000 мл; фосфорнокислого калия (однозамещенного) — 1,0 г; магния сернокислого — 0,5 г; натрия хлористого — 0,5 г; железа сернокислого — 0,01 г; марганца сернокислого — 0,01 г; кальция углекислого — 20,0 г; калия азотнокислого — 4,0 г.

уровне жидкости приток питательного раствора в верхнюю часть бумажной полоски прекращается, бумага высыхает и дальнейшее развитие ризофликтиса приостанавливается.

Освобождение накопительных культур от протозоа достигалось сравнительно легко, так как передвижение зооспор ризофликса в верхние, менее влажные, участки бумаги значительно опережало передвижение туда амеб и других протозоа. Поэтому путем нескольких пересевов из верхних участков окрашенной в розовый цвет бумаги были получены накопительные культуры, свободные от протозоа, содержащие только ризофликтис и сопутствующие бактерии.

Получение чистых культур

Получение бактериологически чистых культур микохитридиевых грибов сопряжено с большими трудностями. Многочисленные попытки разных исследователей получить бактериологически чистые культуры микохитридий не приводили к положительным результатам. Sparow [9] культивировал Cladochytrium nowakowskii на кукурузном агаре, Karling [6] — на почвенно-маннитном агаре, Haskins [5] — на целлюлозе, но ни один из этих авторов не мог освободить культуры от сопутствующих бактерий. Couch [3] культивировала ряд сапрофитных микохитридий на агаровых средах, но постоянное присутствие в культурах бактерий побудило ее высказать предположение, что наличие бактерий является необходимым условием роста хитридиевых грибов. Указания на получение чистых культур имеются у Ward [11], но без каких-либо подробных данных. Stainer [10] описал чистые культуры из американских почв и привел описание методики изолирования, основанной на использовании различной скорости передвижения зооспор ризофликтиса и сопутствующих бактерий.

Наши попытки получить чистые культуры R. rosea при помощи самых разнообразных приемов, в том числе и метода, описанного Стеньером, не привели к положительным результатам. Неудача всех примененных способов обусловливалась двумя причинами: а) ризофликтис реагирует на различные внешние воздействия более чувствительно или так же, как сопутствующие бактерии; б) бактерии-спутники не просто примешаны к ризофликтису, а прикреплены к стенкам зооспорангиев (иногда и к зооспорам) и разносятся вместе с ними, отчего различная собственная подвижность зооспор ризофликтиса и бактерий не может быть использована для их разделения.

Абсолютно чистые культуры ризофликтиса оказалось нетрудно получить при помощи пенициллина, так как микохитридиевый гриб и сопутствующие ему бактерии резко отличаются по чувствительности к этому антибиотику. В пробирки с 5 см³ питательной среды Хетчинсона и полосками фильтровальной бумаги стерильно добавляли 1 см³ воды с 2000 единиц чистого пенициллина. Через 4 суток ризофликтис развивался без видимых под микроскопом бактерий. После повторного пересева в пробирки с пенициллином были получены бактериологически чистые культуры ризофликтиса, из которых произведены пересевы на обычные питательные среды без пенициллина. Окончательная проверка чистоты культур производилась путем пересевов на мясопептонный агар, пептон-сахарные среды, картофельно-сахарные среды и др., на которых не наблюдалось никакого развития.

Чистые культуры R. rosea развиваются на фильтровальной бумаге или целлофане одинаково или более энергично, чем культуры с бактериями. Эти частые культуры сохраняются путем пересевов, производимых два раза в месяц.

Пенициллиновый метод представляет интерес как общий прием получения бактериологически чистых культур микохитридий.

Строение и история развития Rhizophlyctis rosea

Для наблюдений над циклом развития в чашку Петри с агаризованной средой Хетчинсона помещали 10—15 стерильных квадратиков целлофана площадью в 1 см². В центр каждого квадратика производили посев ризофликтиса и помещали чашку при 28°. Через различные промежутки времени отдельные квадратики целлофана переносили на предметное стекло в каплю воды и исследовали под микроскопом. В некоторых случаях препараты окрашивали раствором Люголя (KJ + J), карболовым эритрозином или по Гимза.

Рис. 1

Уже через час после посева наблюдаются вокруг посевного материала оживленно двигающиеся зооспоры шарообразной или овальной формы 4—5 μ в поперечнике, с дистальным жгутиком до 30 μ длиной (рис. 1). В содержимом зооспор наблюдаются немногочисленные, сильно преломляющие свет гранулы около 0,5—0,6 μ в поперечнике. После некоторого периода оживленного движения зооспоры останавливаются, сбрасывают жгутик и начинают прорастать. Прорастающая зооспора увеличивается в размерах до 6—8 μ и становится амебоидом (рис. 2). Амебоиды вскоре начинают образовывать ризоидную систему сначала в виде одного (реже двух) неразветвленных тяжей. Вполне развитая ризоидная система может состоять из многих десятков радиально отходящих, сильно разветвленных ризоидных тяжей, поперечник которых не превосходит 1,0—

Рис. 2

Рис. 3

1,5 μ. Вслед за образованием ризоидной системы помещающийся в центре последней амебоид образует выступ — «проспорангий», в котором дифференцируется оболочка и содержимое будущего зооспорангия

(рис. 3). Описанные превращения протекают в течение первых 24 часов развития. Зооспорангии имеют шарообразную, овальную или неправильную форму. Размеры их сильно варьируют в зависимости от условий роста. В центре зоны роста, где зооспорангии расположены тесно, они имеют 15—20 μ в поперечнике, а на периферии, при редком расположении достигают 80—100 μ. Созревшие зооспорангии имеют оранжево-розовое содержимое, которое дифференцируется на зооспоры (рис. 4). Для выхода зооспор служат сосочковидные выступы — папиллы. Число и размеры их варьируют в зависимости от условий культур. Обычно число папилл от 1 до 10; длина их не больше 10 μ, а ширина 4—6 μ. Открывание папилл происходит не крышечкой, а путем растворения их апикальной части. В открывшихся папиллах некоторое время остается

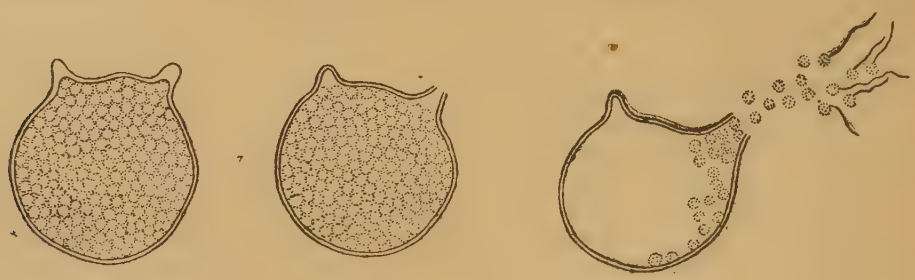


Рис. 4

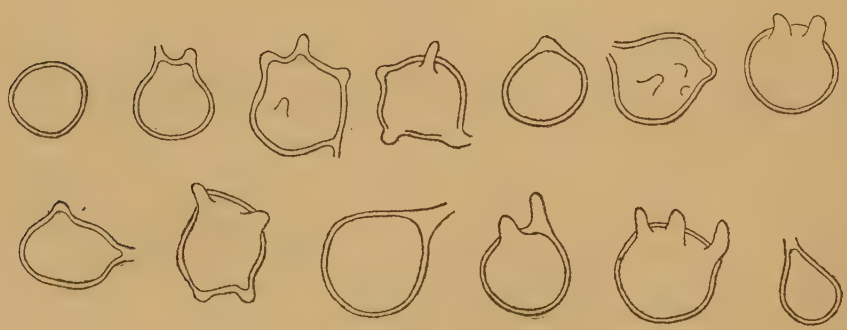


Рис. 5

слизь, после растворения которой зооспоры получают свободный выход наружу. Зооспоры нередко приобретают подвижность, еще находясь внутри зооспорангия. После выхода зооспор остаются многочисленные оболочки пустых зооспорангиев (рис. 5). Некоторые специальные вопросы, относящиеся к строению и циклу развития R. rosea, будут изложены нами в другом месте.

Отношение Rhizophlyctis rosea к внешним условиям

Температура. Оптимальная температура для развития R. rosea около 30°. При посеве в пробирки со средой Хетчинсона и полосками фильтровальной бумаги окрашивание последних в розовый цвет наблюдалось: при 30° — через 4—5 дней: при 26° — через 8 дней; при 16—18° — через 13 дней. Это не совпадает с данными Стеньера [10], который указывает для культур R. rosea из американских почв оптимум температуры в 22—25°.

Свет. Ризофликтис развивается как в темноте, так и на свету. В темновых культурах окраска содержимого зооспорангиев заметно бледнее, они хуже развиты и образование папилл ослаблено. Доста-

точно темновую культуру ризофликтиса осветить в течение 30 минут, чтобы вызвать яркорозовое окрашивание бумаги.

Кислотность среды. Развитие происходит в широких пределах pH. При подкислении среды Хетчинсона с фильтровальной бумагой до pH 4,0 ризофликтис развивается очень медленно; при pH от 4,7 до 8,7 развитие происходит нормально. Верхняя граница pH для ризофликтиса выше 9,0, точнее она не установлена. Эти данные сильно отличаются от результатов, полученных Стеньером, который указывает для нормального развития R. rosea pH = 7,0—8,0; при pH = 6,5 развитие в культуре Стеньера было очень слабое, а при 8,5 оно отсутствовало.

Устойчивость к нагреванию. Культуры ризофликтиса переносят нагревание до 50—55° в течение 15 минут, но погибают от 10-минутного нагревания до 60°.

Устойчивость к высыханию. Ризофликтис хорошо переносит длительное пребывание (в течение года и более) в воздушно-сухой почве. Он переносит также длительное высушивание над концентрированной серной кислотой (в течение нескольких месяцев).

Устойчивость к NaCl. Культуры ризофликтиса нормально развиваются при добавлении к питательной среде 0,2 моля NaCl, но прекращают рост при увеличении концентрации NaCl до 0,3 моля.

Устойчивость к роданатам. Ризофликтис не переносит более 0,04 моля роданата. Уже при этой концентрации развитие сильно замедляется и нарушается нормальная пигментация зооспорангиев. При больших концентрациях высеянные зооспорангии обесцвечиваются и погибают.

Особенности питания Rhizophlyctis rosea

Азотистое питание. Ризофликтис не требователен к условиям азотного питания. В пробирках с минеральным раствором и полосками фильтровальной бумаги с добавлением 0,25% различных азотсодержащих веществ он интенсивно развивается за счет KNO_3 или $NaNO_3$; слабое развитие наблюдается при наличии $(NH_4)_2SO_4$, аспарагина, тирозина, пептона; крайне слабое развитие — за счет гликокола и аланина. При наличии в качестве единственного источника азота тирозина рост ризофликтиса сильно угнетен, при этом бумага окрашивается не в яркорозовый цвет, а в буро-черный. Зооспорангии на среде с тирозином имеют темноокрашенные оболочки и бурое содержимое. Они, однако, жизнеспособны и при пересеве на обычные среды с нитратами дают нормальные культуры. Отношение наших культур R. rosea к источникам азотистого питания резко отличает их от американских культур Стеньера. Последние лучше всего развивались на сернокислом аммонии и совершенно не росли на азотнокислом калии. Наши культуры из казахстанских почв, наоборот, лучше всего развивались на азотнокислом калии и очень слабо — на сернокислом аммонии.

Углеродное питание. В противоположность отсутствию резкой специализации в азотном питании углеродное питание ризофликтиса крайне специализировано. Этот организм совершенно не способен развиваться на сахарозе, лактозе, мальтозе, раффинозе, декстрине, крахмале, манните, глицерине и кальциевых солях уксусной, лимонной и глюконовой кислот. Единственным энергетическим веществом, за счет которого ризофликтис энергично и быстро развивается, является целлюлоза (в виде бумаги или целлофана). Он способен также развиваться за счет глюкозы, но слабо и медленно. Эти результаты совпадают с данными Стеньера о том, что R. rosea развивается только на целлюлозе, целлобиозе и глюкозе. В наших опытах целлобиоза не испытывалась.

Заслуживает внимания любопытная особенность. Некоторые углеводы оказывают резко токсическое действие на ризофликтис. Так, при

внесении на агаризованную среду с 0,5% лактозы окрашенного в яркорозовый цвет кусочка фильтровальной бумаги с зооспорангиями наблюдается через некоторое время полное побеление внесенной культуры. Такое же обесцвечивание зооспорангиев наблюдается при различных резко неблагоприятных воздействиях (очень низкое pH, высокая концентрация NaCNS и др.). Обесцвечивание — явный признак гибели ризофликтиса. Перенесение обесцвеченного посевного материала на нормальные питательные среды с клетчаткой не дает роста ризофликтиса. Такое же действие, как лактоза, но более слабое, оказывает галактоза.

Добавочные питательные вещества. Ризофликтис не нуждается для своего развития в добавочных питательных веществах. Добавление к минеральной питательной среде с фильтровальной бумагой дрожжевой воды (до 10%) слегка ускоряет развитие. Добавление аскорбиновой кислоты, тиамина, биотина не оказывает заметного действия.

Физиологические разновидности Rhizophlyctis rosea

Сравнение культур Rhizophlyctis rosea, изолированных нами из почв Казахстана, и культур того же организма, изолированных Стеньером [10] из американских почв, указывает на ряд существенных физиологических отличий между ними (табл. 1).

Таблица 1

Физиологические особенности культур R. rosea из почв Казахстана и из американских почв

Культуры из американских почв (по Стеньеру)	Культуры из почв Казахстана (по нашим данным)
Оптимальная температура 22—25°	Оптимальная температура 30—32°
Пределы pH 6,5—8,0	Пределы pH 3,7—9,0
Наилучший источник азота $(NH_4)_2SO_4$	Наилучший источник азота KNO_3
KNO_3 не усваивается	$(NH_4)_2SO_3$ — слабо усваивается
Рост возможен только на целлюлозе, целлобиозе, глюкозе	Хороший рост только на целлюлозе; глюкоза слабо усваивается

На основании этих различий надо считать, что существуют различные физиологические разновидности R. rosea. Формы из почв Казахстана представляют особую разновидность этого организма, которую мы называем Rhizophlyctis rosea (De-Bary u. Woronin) A. Fischer var. nitrophila.

Rhizophlyctis rosea как разрушитель целлюлозы

Ризофликтис принадлежит к узко специализированным сапрофитным микохитридиям, для которых единственным доступным энергетическим веществом в условиях почвы является целлюлоза. По сравнению с другими микробными разрушителями целлюлозы (эубактериями, миксобактериями, актиномицетами, гифомицетными грибами) целлюлозоразрушающая активность ризофликтиса представляется чрезвычайно высокой.

В пробирочных культурах с полосками фильтровальной бумаги можно на последней различить три зоны (рис. 6); неокрашенная (рис. 7, *а*), куда еще ризофликтис не проник; в этой зоне волокна бумаги имеют нормальное, ненарушенное строение (рис. 7, *а*); зона яркорозовой окраски бумаги (рис. 7, *б*), в которой интенсивно развивается ризофликтис; здесь волокна бумаги сильно деформированы,

распадаются на отдельные членики, слабо или вовсе не окрашиваются метиленовой синью и не дают фиолетового окрашивания с хлор-цинк-иодом (рис. 7, *б*); наиболее старая зона, уже утратившая розовую окраску; здесь волокна уже совершенно отсутствуют, вся бумага превратилась в слизь.

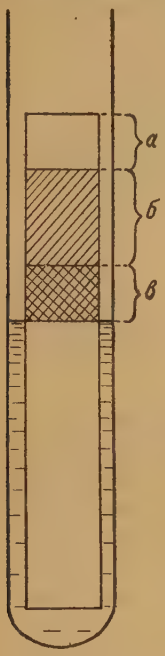


Рис. 6

Способность ризофликтиса разрушать целлюлозу легко может быть установлена не только в чистых культурах этой микохитридии, но и непосредственно в условиях почвы. Почва, содержащая ризофликтис, была помещена в цилиндрические стаканы, и на различную глубину в нее помещены кружки фильтровальной бумаги. После

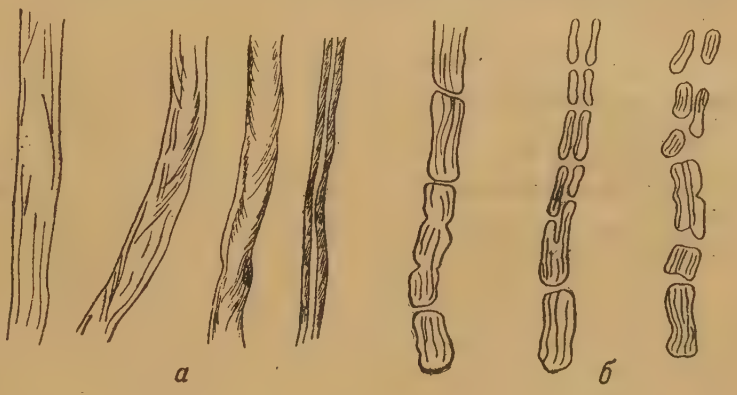


Рис. 7

увлажнения стаканы выдерживали при 28°. Приблизительно через неделю на фильтровальной бумаге с целлюлозирующими бактериями и гифомицетными грибами можно было уже наблюдать обширные розово-окрашенные зоны развития ризофликтиса.

Распространение Rhizophlyctis rosea в почвах

Описываемый организм широко распространен во многих почвах Казахской ССР. Он выделен из ряда светлокаштановых почв, сероземов, солонцов и солончаков. Из черноземных почв ризофликтис выделялся довольно редко. Ареал этого микохитридиевого гриба далеко заходит в высокогорные области. Он был изолирован из многих примитивных почв горно-лугового пояса северных склонов Терскей-Алатау (Киргизия) на высоте до 3900 м. Этот же организм был установлен на выходах гранитов в бассейне реки Кзыл-Су в мелкоземе под мхами, а также в примитивных горно-луговых почвах под злаковым разнотравьем, где он является энергичным разрушителем целлюлозы.

Можно думать, что ризофликтис будет установлен и в почвах средней части СССР.

Целлюлозоразрушающий организм, описанный Мишустиным [1] под названием Angiococcus cellulosae, является, по нашему мнению, не миксобактерией, а микохитридией, именно Rhizophlyctis rosea. В табл. 2 приводятся для сравнения существенные признаки R. rosea (по нашим данным) и A. cellulosae (по описанию Мишустина).

Мишустин ошибочно принял зооспорангии ризофликтиса за плодовые тела миксобактерии, выводные папиллы — за цистофоры, зооспоры — за цисты, гранулярные включения зооспор — за коккобактерии. Указываемое Мишустиным прорастание кокков в палочки, по всей вероятности, объясняется наличием в его накопительных культурах другой подлинной миксобактерии, на что указывает сам автор.

Таблица 2

Сравнение существенных признаков Rhizophlyctis rosea Angiococcus cellulosae

Rhizophlyctis rosea	Angiococcus cellulosae
1. Метод изолирования	1. Метод изолирования
На кремнекислых пластинках с фильтровальной бумагой при посеве комочков почвы. На агаровых пластинках с минеральным раствором и фильтровальной бумагой	На кремнекислых пластинках с фильтровальной бумагой
2. Зооспорангии	2. „Плодовые тела“
Форма: шарообразная, овальная или неправильная	Форма: правильно округлая
Размеры: 15—160 μ	Размеры: 20—150 μ
Окраска: розовая	Окраска: желтоватая или розовая
Выводные папиллы: в числе 1—10 μ длиной до 10 μ	„Цистофоры“: в числе 1—3 длиной до 10 μ
Оболочка: остающаяся после выхода содержимого образует складки	Оболочка: остающаяся после выхода содержимого образует складки
3. Зооспоры	3. „Цисты“
Формируются внутри зооспорангия. Форма: шарообразная или овальная	Формируются внутри плодового тела
Размеры: 4—6 μ	Размеры: 5—15 μ, большей частью 5—6 μ
Содержимое: гранулы размером 0,5—0,6 μ	Содержимое: „коккобактерии“ и кокки размером 0,5—0,6 μ

С точки зрения эколого-географической изменчивости микохитридиевых грибов представляет интерес, будет ли ризофликтис из почв средней части СССР относиться к той же разновидности Rhizophlyctis rosea var. nitrophila, которая характерна для почв Казахстана, или он будет представлен аммонийфильными формами, описанными для почв средней части Американского материка.

Выводы

1. В различных почвах Казахстана широко распространена целлюлозоразрушающая микохитридия Rhizophlyctis rosea (De-Bary u. Woronin) A. Fischer. При помощи пенициллина получены чистые культуры этого организма.

2. Оптимальная температура развития R. rosea около 30°. Развитие происходит в широких пределах pH от 4,7 до 9,0 и выше. Организм хорошо переносит длительное пребывание в воздушно-сухой почве и в атмосфере над концентрированной серной кислотой. R. rosea не переносит значительных концентраций NaCl (больше 0,2 моля) и отличается повышенной чувствительностью к роданатам.

3. R. rosea мало специализирован в отношении источников азотного питания. Лучше всего он развивается за счет нитратов, слабо растет при наличии сернокислого аммония, аспарагина, тирозина, пептона и крайне слабо за счет аланина и гликоколя.

4. В противоположность азотному, углеродное питание крайне специализировано. R. rosea лучше всего развивается за счет целлюлозы, слабее при наличии глюкозы и вовсе не способен развиваться за счет

сахарозы, мальтозы, лактозы, галактозы, раффинозы, маннита, глицерина и солей органических кислот. Некоторые углеводы (лактоза, галактоза) оказывают на R. rosea токсическое действие.

5. Выделенные из почв Казахстана формы R. rosea отличаются по ряду физиологических особенностей от форм того же организма, изолированных Стеньером из американских почв. Формы R. rosea, характерные для почв Казахстана, можно рассматривать как особую разновидность этого организма, которую предлагается именовать Rhizophlyctis rosea var. nitrophila.

Институт почвоведения
Академии Наук Казахской ССР
Алма-Ата

Получено 29.III.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишустин Е. Н. Миксобактерии, разлагающие целлюлозу. Микробиология, VII (4), 1938.
2. Новогрудский Д. М. и Теплякова З. Ф. К биологии сапрофитной целлюлозоразрушающей почвенной микохитридии. Бюлл. Московского об-ва испыт. природы. Отд. биологии, 1949.
3. Couch J. N. Technic for collection, isolation and culture of chytrids. J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 55, 1939.
4. Hanson A. A morphological, developmental and cytological study of four saprophytic chytrids. Amer. J. Botany, 32; 431, 479, 1945; 33; 389, 1946.
5. Haskins R. H. Cellulose asa substratum for saprophytic chytrids. Amer. J. Botany, 26, 1939.
6. Karling J. A further study of Cladochytrium replicatum with special reference to its distribution, host range, and culture on artificial media. Amer. J. Botany, 22, 1935.
7. Karling J. Brazilian chytrids. V. Nowakowskiella macrospora. n. sp. and other polycentric species. Amer. J. Botany, 32, 1945.
8. Karling J. Keratynophylic chytrids. Amer. J. Botany, 34, 1947.
9. Sparow F. Two new chytridiaceous fungi from Cold Spring Harbor. Amer. J. Botany, 18, 1931.
10. Stainer R. The cultivation and nutrient requirements of a chitridiaceous fungus, Rhizophlyctis rosea. J. Bacter., 43, 1942.
11. Ward M. W. Observations on Rhizophlyctis rosea. J. Elisha Mitchell Sci Soc., 55. 1939.

ОБРАЗОВАНИЕ АЦЕТОИНА И 2,3-БУТИЛЕНГЛИКОЛЯ КУЛЬТУРОЙ AEROBACTER AEROGENES

Н. В. Орлова

В настоящее время накопилось много фактов, свидетельствующих о том, что условия культивирования оказывают значительное влияние на жизнедеятельность микроорганизмов.

Особенно это относится к активной кислотности среды и условиям аэрации.

Известно, что для каждого микроорганизма существует определенная зона pH, в которой он может развиваться [11].

Оптимум pH для развития различных микроорганизмов значительно колеблется. Некоторые микроорганизмы способны регулировать реакцию среды. К таким бактериям относятся ацетоно-бутиловые [1, 6, 8, 13] и ацетоно-этиловые [5] бактерии. Однако далеко не все микроорганизмы способны регулировать реакцию среды, поддерживая ее в зоне, благоприятной для развития. Известны случаи, когда бактерии образуют такое количество кислот, которое приостанавливает их развитие. Такими бактериями являются молочнокислые [14], уксуснокислые [3, 5], маслянокислые [7].

Активная кислотность среды влияет не только на развитие бактерий, но и на соотношение между образовавшимися в результате брожения продуктами. Изменяя pH среды, можно добиться коренных изменений в ходе брожения, сделав промежуточными продуктами те, которые раньше были конечными. Иллюстрировать вышеуказанное можно на примере ацетоно-бутилового брожения.

В 1931 г. Шапошников [11] впервые высказал мысль о двухфазности ацетоно-бутилового брожения. В первые часы брожения, осуществляемого Clostridium acetobutylicum, накапливаются преимущественно кислоты (уксусная, масляная), нейтральные продукты (ацетон, бутиловый спирт) почти не образуются, среда сильно подкисляется. После этой первой фазы брожения наступает вторая, в которой часть образовавшихся кислот перерабатывается в нейтральные продукты. В этой фазе образуются преимущественно нейтральные продукты, pH удерживается на одном уровне. Таково нормальное течение ацетоно-бутилового брожения.

Если же к среде добавить мел, т. е. нейтрализовать кислоты по мере их образования, то вторая фаза брожения не наступает, нейтральные продукты образуются в незначительных количествах, и брожение становится похожим на маслянокислое.

Что касается влияния активной кислотности среды на широко распространенные среди микроорганизмов процессы образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля, то по этому вопросу также имеются некоторые данные.

Mickelson и Werkman [16] показали, что при сбраживании глюкозы Aerobacter indologenes ацетоин и 2,3-бутиленгликоль образуются только в кислой среде.

Они установили критическую границу pH (для Aerobacter indologenes pH = 6,3). Выше pH равной 6,3, по данным вышеупомянутых авторов, не образуется ацетоина и 2,3-бутиленгликоля, но зато образуется много летучих кислот.

Silwerman и Werkman [17] показали такую же зависимость образования ацетоина от pH среды при сбраживании пировиноградной кислоты карбинольным энзимом, хотя не установили такой строгой границы pH, как Mickelson и Werkman.

Это весьма интересное явление упомянутые авторы связывают с наличием или отсутствием в среде свободной уксусной кислоты и водорода. Свободная уксусная кислота может существовать только в кислой среде и только в этих условиях, по мнению названных авторов, может являться источником ацетоина и 2,3-бутиленгликоля. Подобное объяснение нам кажется не совсем правильным и достаточным. Дело, вероятно, не только в уксусной кислоте и водороде, но и во всей совокупности условий, вызывающих образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля. Кроме того, представляется необходимым связать процесс ацетоиновой конденсации с процессом роста и развития бактерий, ибо образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля мыслится только путем синтеза, и следовательно, вряд ли может быть энергетическим процессом, а если принять во внимание, что многие бактерии превращают в ацетоин и 2,3-бутиленгликоль до 30 и даже до 50% сброженного сахара [10], то естественно возникает вопрос о биологической роли этого процесса. Именно с этой точки зрения мы поставили себе задачу рассмотреть в предлагаемой работе вопрос о влиянии активной кислотности среды на брожение глюкозы Aerobacter aerogenes.

Не меньшее влияние оказывают на процессы брожения и развитие бактерий условия аэрации. В отношении влияния условий аэрации на процессы образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля нет согласованности экспериментальных данных.

Горовиц-Власова и Родионова [2], а также Walpole [18] показали, что пропускание кислорода увеличивало количество образовавшегося ацетоина.

Однако Adams и Stanier [15] не могли доказать подобное влияние. Таким образом в вопросе о влиянии условий аэрации на процессы образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля нет еще достаточной ясности.

Изучение влияния условий аэрации на брожение глюкозы Aerobacter aerogenes — вторая задача нашей работы.

Экспериментальная часть

Объектом исследования был избран организм из группы Aerogenes — Aerobacter aerogenes.

Подробнее об объекте исследования и использованной методике смотри в предыдущей работе [9].

Влияние pH среды на процесс образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля культурой Aerobacter aerogenes

Изучение вопроса о влиянии pH среды на брожение глюкозы Aerobacter aerogenes было начато с опытов, в которых брожения проводились при разных начальных pH.

С этой целью ряд колб с синтетической средой следующего состава: 0,5 — 1% глюкозы, 0,5 пептона Дифко, 0,2% K_2HPO_4 и KH_2PO_4 и с разными начальными pH — заражался культурой Aerobacter aerogenes. Начальные pH создавались соотношением KH_2PO_4 и K_2HPO_4 в среде, а для того чтобы pH во время брожения сдвигался не сильно, бралось очень небольшое количество глюкозы (0,5—1%). Условия брожения аэробные.

Предварительные опыты, в которых определялся только ацетоин и 2,3-бутиленгликоль, показали, что pH оказывает значительное влияние

на образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля. В следующих опытах, кроме ацетоина и 2,3-бутиленгликоля, определялись также спирт и летучие кислоты.

Результаты сведены в табл. 1. Конечные продукты выражены в процентах от сброженного сахара.

Таблица 1

pH		Ацетоин	2,3-бутиленгликоль	Летучие к-ты *	Этиловый спирт
начальное	конечное				
		Опыт 5			
5,1	6,3	5,52	18,7	0,66	10,8
6,0	6,8	8,07	20,12	1,62	9,9
7,1	7,0	3,83	14,5	4,68	14,0
7,8	7,3	2,32	5,21	6,33	14,8
		Опыт 6			
5,3	6,0	5,46	19,99	1,95	12,4
6,1	6,3	10,66	22,28	1,77	8,9
7,0	6,8	5,19	18,46	3,06	9,91
8,4	7,8	2,66	8,8	7,63	9,6

* Летучие кислоты в этих и следующих опытах пересчитаны на уксусную кислоту.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что активная кислотность среды оказывает огромное влияние на брожение глюкозы Aerobacter aerogenes, резко меняя соотношение конечных продуктов брожения. В условиях кислой реакции среды до 30% сброженной глюкозы превращается в нейтральные продукты с четырехчленной цепью — 2,3-бутиленгликоль и ацетоин, а летучих кислот образуется очень незначительное количество (1—2%). В условиях щелочной реакции среды соотношение меняется: количество летучих кислот увеличивается (до 8%), а количество нейтральных продуктов уменьшается (до 7%).

Молочная кислота в приведенных опытах не определялась, но, как будет видно из дальнейшего (табл. 2 и 3), ее количество также зависит от pH среды. В щелочной среде молочной кислоты образуется в 2—3 раза больше, чем в кислой.

Оптимальное pH для образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля лежит в пределах 6,0—6,5.

В предыдущей серии опытов учитывались только конечные продукты брожения глюкозы уже после того, как весь сахар был сброжен. Естественно, что для того чтобы глубже проникнуть в сущность процесса, недостаточно рассмотреть его конечный результат, а необходимо изучить процесс во времени, в его динамике. В связи с резким различием соотношения конечных продуктов при брожении в условиях кислой и щелочной реакции среды интересно поставить опыты по динамике брожения с разными начальными pH (щелочным и кислым) и таким образом проследить, как протекают процессы брожения, приводящие к столь разным результатам.

Следующие две серии опытов посвящены решению этого вопроса. Среда та же, что и в предыдущих опытах, но с 2% глюкозы.

В одной серии колб начальное pH равно 6 (благоприятное для образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля), в другой pH равно 8,5 (не бла-

гоприятное для образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля). Колбы заражались одновременно и через определенные промежутки времени брались для проведения анализов (через 4, 8, 11, 25 и 75 часов). Условия брожения аэробные.

Результаты представлены в табл. 2 и 3 и на рис. 1.[1]

Таблица 2

Динамика брожения глюкозы при начальном pH, равном 6,0

Время от начала брожения в часах	pH	Сброжено сахара в мМ/л	Образовано (в мМ/л)					Число бактерий в 1 мл
			ацетоина	2,3-бутиленгликоля	летучих к-т	молочной к-ты	этилового спирта	
0	6	0	—	—	—	—	—	$7{,}14 \cdot 10^7$
4	5,86	9,13	0	0,94	4,07	—	4,8	$11{,}48 \cdot 10^7$
8	5,37	25,0	1,03	3,49	8,79	—	9,7	$17{,}5 \cdot 10^7$
12	5,2	35,7	2,23	5,65	7,64	5,64	14,6	$23{,}6 \cdot 10^7$
25	4,66	54,6	7,6	8,88	6,43	8,7	—	$50{,}3 \cdot 10^7$
75	4,54	70,2	12,2	2,40	4,08	9,51	21,8	$75{,}6 \cdot 10^7$

Таблица 3

Динамика брожения глюкозы при начальном pH, равном 8,5

Время от начала брожения в часах	pH	Сброжено сахара в мМ/л	Образовано (в мМ/л)					Число бактерий в 1 мл
			ацетоина	2,3 бутиленгликоля	летучих к-т	молочной к-ты	этилового спирта	
0	8,5	0	—	—	—	—	—	$6{,}8 \cdot 10^7$
4	8,3	7,6	0	0	11,57	—	1,05	$10{,}1 \cdot 10^7$
8	8,1	18,8	0	0	21,5	4,2	4,26	$19{,}0 \cdot 10^7$
12	7,85	27,7	0	0	23,8	9,52	5,8	$28{,}0 \cdot 10^7$
25	6,83	40,52	0,32	0,96	34,4	13,0	17,5	$46{,}3 \cdot 10^7$
75	4,98	43,9	5,27	4,14	18,5	20,08	19,4	—

Данные табл. 2 полностью согласуются с полученными ранее [9]. Сравнение данных табл. 2 и 3 (рис. 1) позволяет утверждать, что, независимо от начальной реакции среды (pH равно 6 и pH равно 8,5), брожение начинается с накопления кислот и подкисления субстрата.

В условиях щелочной реакции среды темп накопления кислот более быстрый, чем в условиях кислой реакции, и соответственно быстрее происходит подкисление субстрата (при начальном pH, равном 6, через 75 часов после начала брожения количество кислот равно 13,6 мМ/л и pH падает за это время с 6 до 4,5, а при начальном pH, равном 8,5, через 75 часов количество кислот равно 38,13 мМ/л и pH снижается с 8,5 до 4,9).

В условиях кислой реакции среды количество летучих кислот достигает максимума уже через 8 часов после начала брожения, в то время

[1] На рис. 1, 3 и 4 продукты брожения и сброженный сахар выражены в эквивалентах триоз, т. е. количества веществ рассчитаны в мМ/л и в случае глюкозы, ацетоина и 2,3-бутиленгликоля умножены на 2 с тем расчетом, что глюкоза при брожении расщепляется на 2 триозы, а ацетоин и 2,3-бутиленгликоль могут образоваться только из двух триоз.

как в условиях щелочной реакции среды увеличение количества летучих кислот продолжается до 25 часов, т. е. до тех пор, пока субстрат значительно не подкислится. Образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля в кислой среде начинается уже с 4—8-го часа, а в щелочной только с 25-го часа.

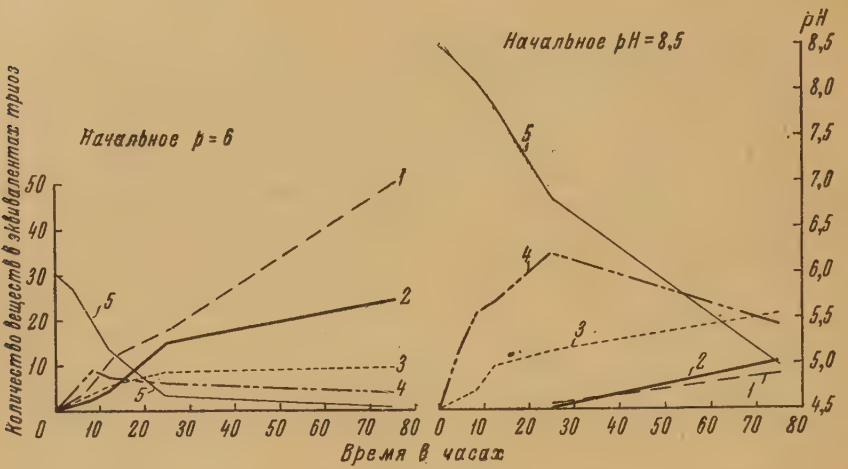


Рис. 1. Динамика брожения глюкозы Aerobacter aerogenes в зависимости от активной кислотности среды

1 — 2,3-бутиленгликоль; *2* — ацетоин; *3* — молочная кислота; *4* — летучие кислоты; *5* — pH

Интересно отметить связь начала образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля с pH среды, с одной стороны, и с моментом перелома кривой летучих кислот — с другой. Приведенные данные еще раз подчеркивают, что ацетоин и 2,3-бутиленгликоль могут образовываться только в кислой среде, поэтому при брожении с начальным pH, равным 6, они накапливаются в большем количестве, чем при брожении с начальным pH, равным 8,5, где их образование начинается только через 25 часов после начала брожения, когда pH сдвигается в кислую зону. Начало образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля совпадает с переломом кривой летучих кислот (смотри результаты 8-часового опыта в условиях кислой реакции среды и 25-часового опыта в условиях щелочной реакции среды), и нарастание количеств ацетоина и 2,3-бутиленгликоля сопровождается уменьшением количеств летучих кислот. Это дает возможность предположить переход уксусной кислоты в ацетоин и 2,3-бутиленгликоль.

Так как исследуемый штамм Aerobacter aerogenes образует, кроме уксусной кислоты, муравьиную кислоту, представлялось необходимым провести количественный анализ летучих кислот. С этой целью в предыдущей серии опытов по динамике брожения в условиях щелочной и кислой реакций среды в некоторых случаях были проведены анализы летучих кислот, т. е. отдельно определены уксусная и муравьиная кислоты.

Полученные результаты приведены в табл. 4 и на рис. 2.

Из приведенных данных можно заключить, что по ходу брожения глюкозы, вызванного Aerobacter aerogenes, меняется не только общее количество летучих кислот, но и соотношение уксусной и муравьиной кислот.

По всей вероятности, регулирующая роль в этом явлении принадлежит активной кислотности среды. Так, при pH, равном 8,1, на долю уксусной кислоты приходится всего 64,5%, в то время как при pH, равном 4,98,— 100%. Муравьиная кислота накапливается в значительных количествах только в условиях щелочной реакции среды. В кислой

Таблица 4

Соотношение уксусной и муравьиной кислот по ходу брожения глюкозы

Время от начала брожения в часах	pH	Общее количество летучих к-т	Количество уксусной к-ты	Количество муравьиной к-ты	Уксусная к-та в %	Муравьиная к-та в %
При начальном pH, равном 6						
0	6,0	—	—	—	—	—
8	5,37	52,78	47,23	4,26	89,5	10,5
25	4,66	38,59	36,11	2,13	93,5	6,4
При начальном pH, равном 8,5						
0	8,5	—	—	—	—	—
8	8,1	129,0	83,0	35	64,5	35,5
25	6,8	207,0	145	48	70,0	30,0
75	4,98	111,0	111	0	100	0

Примечание. Кислоты приведены в миллиграммах на 100 мл культуральной жидкости, а их соотношение — в процентах.

среде количество муравьиной кислоты по сравнению с количеством уксусной незначительно.

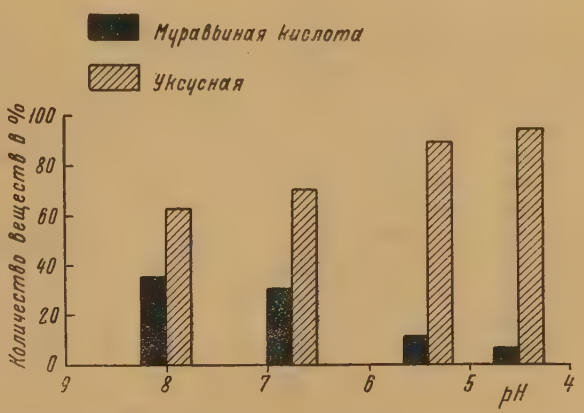


Рис. 2. Процентное соотношение уксусной и муравьиной кислот при брожении глюкозы в в зависимости от pH среды

Связан ли процесс разложения муравьиной кислоты с жизнедеятельностью бактерий, сказать трудно. Не исключена возможность, что такой связи не существует, а процесс разложения нестойкой муравьиной кислоты протекает независимо от жизнедеятельности бактерий и регулируется активной кислотностью среды.

Влияние условий аэрации на брожение глюкозы Aerobacter aerogenes

Второй задачей нашей работы было выяснение вопроса об участии кислорода воздуха в процессах образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля.

Предварительные опыты показали, что соотношение ацетоина и

2,3-бутиленгликоля меняется в зависимости от условий аэрации. Для создания аэробных условий среда наливалась в колбы тонким слоем (не больше 2 см). Анаэробные условия создавались высоким столбом жидкости в опытных пробирках без парафиновых пробок, поэтому некоторое влияние кислорода воздуха не было исключено. Среда та же, что и в предыдущих опытах, pH благоприятное для образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля, т. е. около 6,0. Анализы проводились через неделю после заражения, т. е. тогда, когда весь сахар был сброжен. Данные сведены в табл. 5.

Таблица 5

Влияние условий аэрации на соотношение ацетоина и 2,3-бутиленгликоля

Условия опыта	Количество ацетоина	Количество 2,3-бутиленгликоля	% ацетоина	% 2,3-бутиленгликоля
Аэробные	107,4	227,85	32,3	67,7
Анаэробные	23,0	137,9	14,3	85,7

Примечание. Количества ацетоина и 2,3-бутиленгликоля приведены в миллиграммах на 100 мл культуральной жидкости, а их соотношения — в процентах.

Следовательно, кислород воздуха оказывает значительное влияние на соотношение ацетоина и 2,3-бутиленгликоля.

В анаэробных условиях процесс образования ацетоина подавлен: на 100 мл культуральной жидкости образовалось всего 23 мг ацетоина, в то время как в аэробных условиях — 107,4 мг. Приведенные данные наводят на мысль об участии кислорода воздуха в процессе образования ацетоина.

Для разъяснения этого вопроса были поставлены опыты по динамике брожения в аэробных и анаэробных условиях.

Эти опыты проводились так же, как и предварительные, но анаэробные условия создавались не только высоким слоем жидкости, но и парафиновыми пробками.

Полученные данные сведены в табл. 6 и 7 и на рис. 3.

Прежде всего бросается в глаза влияние условий аэрации на скорость брожения сахара. Через 14 часов в аэробных условиях сброжено 66,26 мМ/л сахара, а в анаэробных условиях только 50,06 мМ/л. Кроме того, в аэробных условиях уже через 69 часов сахар почти полностью сброжен, в то время как в анаэробных условиях и через 133 часа остается значительное количество несброженного сахара. Следовательно, в аэробных условиях сахар сбраживается быстрее, чем в анаэробных.

Что касается развития бактерий, то в первые двое суток оно приблизительно одинаково, зато к концу брожения число бактерий в аэробных условиях значительно выше. Можно себе представить, что это явление связано с процессами окисления кислородом воздуха 2,3-бутиленгликоля.

Еще более заметное влияние оказывает кислород воздуха на образование ацетоина: ацетоин образуется только в аэробных условиях. Наличие ничтожных количеств ацетоина в анаэробных условиях может быть объяснено недостаточно полным анаэробиозом.

Таким образом, представляется возможным заключить, что несмотря

Таблица 6

Динамика брожения глюкозы Aerobacter aerogenes в аэробных условиях

Время от начала брожения в часах	pH	Сброжено сахара в мМ/л	Образовано (в мМ/л)					Число бактерий в 1 мл
			ацетоина	2,3-бутиленгликоля	летучих к-т	молочной к-ты	этилового спирта	
0	6,0	0	—	—	—	—	—	$5{,}2 \cdot 10^7$
14	5,8	66,26	1,01	5,27	22,6	9,5	19,8	$8{,}7 \cdot 10^7$
49	5,4	95,84	1,33	35,6	7,45	21,7	44,5	$10{,}9 \cdot 10^7$
69	5,3	97,97	2,97	34,08	7,35	27,83	36,1	$18{,}2 \cdot 10^7$
91	5,3	99,25	6,65	29,5	6,4	43,5	46,8	$16{,}8 \cdot 10^7$
133	6,2	99,25	12,3	24,3	8,3	—	43,8	$23{,}7 \cdot 10^7$

Таблица 7

Динамика брожения глюкозы Aerobacter aerogenes в анаэробных условиях

Время от начала брожения в часах	pH	Сброжено сахара в мМ/л	Образовано (в мМ/л)					Число бактерий в 1 мл
			ацетоина	2,3-бутиленгликоля	летучих к-т	молочной кты-	этилового спирта	
0	6,1	0	—	—	—	—	—	$5{,}2 \cdot 10^7$
14	5,8	50,06	0,04	3,75	30,3	7,5	10,23	$7{,}8 \cdot 10^7$
49	5,5	83,66	0,17	26,97	13,1	17,5	38,43	$11{,}7 \cdot 10^7$
91	5,3	84,4	0,35	42,37	7,43	37,33	30,42	$13{,}7 \cdot 10^7$
133	5,8	85,76	0	—	16,03	23,7	29,8	$12{,}2 \cdot 10^7$

на то, что брожение глюкозы Aerobacter aerogenes является анаэробным процессом и может успешно протекать без доступа кислорода, в

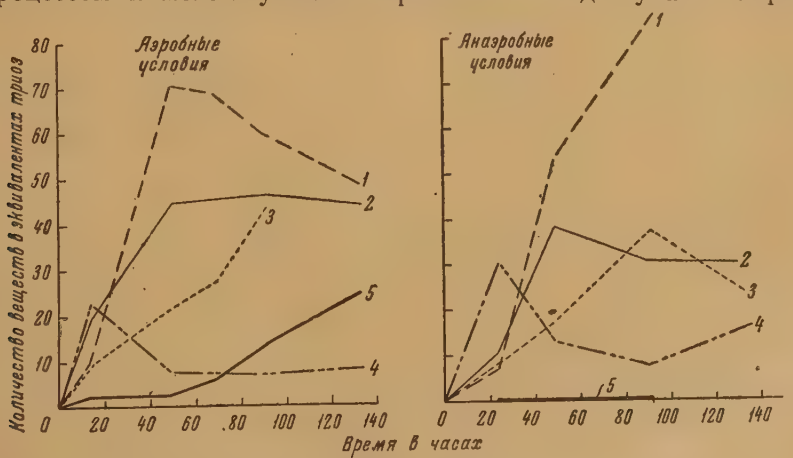


Рис. 3. Динамика брожения глюкозы Aerobacter aerogenes в зависимости от условий аэрации

1 — 2,3-бутиленгликоль; *2* — этиловый спирт; *3* — молочная кислота; *4* — летучие кислоты; *5* — ацетоин

аэробных условиях кислород воздуха принимает несомненное участие в этом брожении: он необходим для образования ацетоина.

Сбраживание Aerobacter aerogenes 2,3-бутиленгликоля

Ранее полученные данные [9], а также рассмотрение данных, сведенных в табл. 7, убеждают нас, что 2,3-бутиленгликоль не может считаться окончательным продуктом брожения глюкозы Aerobacter aerogenes. Возникает 2,3-бутиленгликоль только в условиях кислой реакции среды и после исчезновения сахара в среде может быть потреблен бактериями. В этой связи немалый интерес представляет вопрос о судьбе 2,3-бутиленгликоля.

Из литературы известно, что 2,3-бутиленгликоль окисляется многими бактериями в ацетоин [2, 18]. Данные, сведенные в табл. 7, дают возможность предположить способность окислить 2,3-бутиленгликоль в ацетоин у исследуемого штамма Aerobacter aerogenes.

Для выяснения этого вопроса были поставлены опыты, в которых брожение велось на среде того же состава, что и в предыдущих опытах, но глюкоза была заменена 2,3-бутиленгликолем. Препарат 2,3-бутиленгликоля был получен из Всесоюзного научно-исследовательского института спиртовой промышленности от Первозванского.

Брожение проводилось в аэробных и анаэробных условиях. Так как Aerobacter aerogenes развивается на среде с пептоном и фосфатами без 2,3-бутиленгликоля и образует на этой среде небольшое количество летучих кислот и спирта, то к каждому опыту ставился контроль на этой среде. Анализы проводились через четверо суток после заражения. Данные сведены в табл. 8 и на рис. 4.

Таблица 8

Сбраживание 2,3-бутиленгликоля культурой Aerobacter aerogenes

Условия опыта	Сброжено 2,3-бутиленгликоля в мМ/л	Образование (в мМ/л)			Число бактерий	
		ацетоина	этилового спирта	летучих к-т	начальное	конечное
Аэробные						
Опыт	5,57	5,4	1,33	2,5	$1{,}1 \cdot 10^8$	$4{,}6 \cdot 10^8$
Контроль	—	0	1,1	2,4	$1{,}1 \cdot 10^8$	$2{,}7 \cdot 10^8$
За вычетом контроля	5,57	5,4	0,23	0,1	—	—
Анаэробные						
Опыт	4,69	1,03	5,2	4,2	$1{,}1 \cdot 10^8$	$3{,}3 \cdot 10^8$
Контроль	—	0	0	1,5	$1{,}1 \cdot 10^8$	$1{,}9 \cdot 10^8$
За вычетом контроля	4,69	1,03	5,2	2,7	—	—

Исследуемый штамм Aerobacter aerogenes сбраживает 2,3-бутиленгликоль в среде с пептоном.

Это следует, во-первых, из уменьшения количества 2,3-бутиленгликоля к концу брожения и, во-вторых, из подсчета числа бактерий.

На среде с пептоном без 2,3-бутиленгликоля в аэробных условиях число бактерий возросло в 3 раза (с $1{,}1 \cdot 10^8$ до $2{,}7 \cdot 10^8$), в анаэробных условиях — в 2 раза (с $1{,}1 \cdot 10^8$ до $1{,}9 \cdot 10^8$), а на среде с 2,3-бутиленгликолем в аэробных условиях в 4 раза (с $1{,}1 \cdot 10^8$ до $4{,}6 \cdot 10^8$) и в анаэробных условиях в 3 раза (с $1{,}1 \cdot 10^8$ до $3{,}3 \cdot 10^8$). Судьба 2,3-бутиленгликоля в аэробных и анаэробных условиях различна. В аэробных условиях 2,3-бутиленгликоль полностью окисляется Aerobacter aerogenes в ацетоин. В анаэробных условиях ацетоина образуется только

очень небольшое количество. Основная масса 2,3-бутиленгликоля превращается в спирт и летучие кислоты. Приведенные данные, с одной стороны, подтверждают сделанный ранее вывод об участии кислорода воздуха в образовании ацетоина, а с другой стороны, разъясняют вопрос о судьбе 2,3-бутиленгликоля, возникший при изучении динамики брожения глюкозы [19].

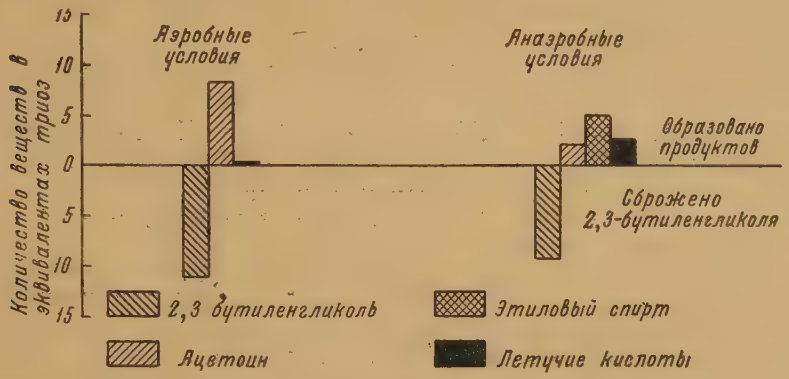


Рис. 4. Сбраживание 2,3-бутиленгликоля в зависимости от условий аэрации

Очевидно, уменьшение количеств 2,3-бутиленгликоля, которое наблюдалось по ходу брожения глюкозы, связано в аэробных условиях с его превращением в ацетоин, а в анаэробных условиях — с его превращением в летучие кислоты.

Обсуждение результатов [2]

Если проследить за динамикой образования продуктов при брожении глюкозы Aerobacter aerogenes [9], то бросается в глаза, что брожение начинается с энергичного образования кислот: уксусной, муравьиной, молочной, а также этилового спирта.

Если искусственно поддерживать активную кислотность среды в щелочной зоне, то названные продукты являются основными конечными продуктами брожения: ни ацетоина, ни 2,3-бутиленгликоля не образуется, а если они и образуются, то в незначительных количествах.

Если же щелочную реакцию среды искусственно не поддерживать, то накопление кислот вызывает подкисление субстрата. При наличии значительных количеств сахара это подкисление может быть очень заметным (от 8,5 и выше до 4,5—4,4). По мере подкисления субстрата происходят существенные изменения в течение брожения. Как только pH падает до 6,5—6, начинается потребление уксусной кислоты, несмотря на наличие несброженного сахара в среде. Потребление уксусной кислоты сопровождается возникновением нейтральных продуктов с четырехчленной цепью — ацетоина и 2,3-бутиленгликоля. Эти последние продукты образуются только в условиях кислой среды (при pH, равном 6,5 и ниже).

Молочная кислота при известных условиях также может потребляться бактериями. Это происходит тогда, когда pH среды падает до 4,5—4,4, близкому к предельному значению для развития данного штамма бактерий [10,9].

Если бы произошло дальнейшее накопление кислот, то развитие бактерий должно было бы прекратиться, но, однако, этого не происходит,

[2] При обсуждении результатов приняты данные как этой статьи, так и предыдущей [19].

так как количество молочной кислоты уменьшается, а вместе с этим уменьшается кислотность субстрата и брожение продолжается.

Подобно уксусной и молочной кислотам муравьиная кислота также накапливается в значительных количествах только в щелочной среде.

По мере подкисления субстрата ее количество уменьшается и при pH, равном 6 и ниже, в среде присутствует лишь ничтожное количество муравьиной кислоты.

Описанное брожение до некоторой степени напоминает ацетоно-бутиловое и ацетоно-этиловое брожения.

Здесь также можно выделить две фазы: первую — кислотную и вторую — собственно ацетоиновую или 2,3-бутиленгликолевую. В первой фазе образуются преимущественно кислоты (уксусная, молочная, муравьиная), ацетоин и 2,3-бутиленгликоль или совсем не образуются или образуются в незначительных количествах.

Во второй фазе основными продуктами являются ацетоин и 2,3-бутиленгликоль, а количество кислот в этой фазе уменьшается.

Дополнительные опыты по влиянию активной кислотности среды на рост бактерий показали, что оптимальное pH для роста лежит в пределах 6,8—6,5, а интенсивное образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля начинается только при pH около 6, т. е. вторая фаза протекает при pH, не благоприятном для роста и развития бактерии. Соотношение первой и второй фаз брожения определяется активной кислотностью среды.

Многие бактерии превращаются в ацетоин и 2,3-бутиленгликоль до 50% сброженного сахара. Наш штамм Aerobacter aerogenes превращает в ацетоин и 2,3-бутиленгликоль до 30% сброженного сахара. В связи с этим возникает вопрос: какое значение имеет образование этих веществ в жизни бактерий?

Образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля мыслится только путем синтеза 2 молекул уксусного альдегида. Этот синтез, очевидно, сопровождается поглощением энергии, поэтому большее количество энергии выделяется в том случае, когда конечными продуктами брожения глюкозы являются кислоты и спирт, чем когда ими являются ацетоин и 2,3-бутиленгликоль. С этой точки зрения невозможно объяснить биологическое значение образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля. С другой стороны, известны случаи, когда образование и накопление в среде тех или иных веществ необходимы для создания благоприятных условий для развития данного вида и для борьбы с конкурентами за овладание субстратом. Факты такого рода мы находим, например, в случае ацетоно-этилового, ацетоно-бутилового брожений и образования кислот грибами. В свете этих данных образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля можно рассматривать как приспособление для нейтрализации избыточной кислотности среды, вредной для микроорганизма.

В пользу этого предложения говорит то обстоятельство, что ацетоин и 2,3-бутиленгликоль образуются только в условиях кислой реакции среды, т. е. в условиях, не благоприятных для роста и развития бактерий. Кроме того, образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля сопровождается потреблением кислот (уксусной, молочной и муравьиной) и снижением кислотности среды.

Выводы

1. Течение процесса сбраживания глюкозы в культуре Aerobacter aerogenes меняется в зависимости от активной кислотности среды: в щелочной среде основными продуктами брожения являются уксусная, молочная и муравьиная кислоты и этиловый спирт; ацетоин и 2,3-бутиленгликоль или совсем не образуются, или образуются в незначительных количествах; в кислой же среде, наоборот, основными по количест-

ву продуктами брожения являются 2,3-бутиленгликоль, ацетоин и этиловый спирт, образование кислот значительно подавлено.

Оптимальное pH для образования ацетоина и 2,3-бутиленгликоля лежит в пределах 6.0—6,5.

2. Условия аэрации также оказывают значительное влияние на сбраживание глюкозы культурой Aerobacter aerogenes; кислород воздуха необходим для образования ацетоина, который в анаэробных условиях не образуется.

3. 2,3-бутиленгликоль в пептонной среде без сахара сбраживается культурой Aerobacter aerogenes как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В аэробных условиях 2,3-бутиленгликоль окисляется в культуре Aerobacter aerogenes в ацетоин. В анаэробных условиях из 2,3-бутиленгликоля образуется незначительное количество ацетоина; основная масса 2,3-бутиленгликоля превращается в этиловый спирт и летучие кислоты.

В заключение выражаю глубокую и искреннюю благодарность профессору В. Н. Шапошникову за руководство и помощь в работе.

Кафедра микробиологии
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова

Получено 20.X.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Бехтерева М. Н., Иерусалимский Н. Д. Динамика и баланс ацетонобутилового брожения. Микробиология, V, 777, 1936.
2. Горовиц-Власова Л. М., Родионов Е. А. Über die Azetoingärung. Ctbl. Bakt. Abt., 11, 87, 333, 1933.
3. Дратвина Т. В. Окисление уксуснокислыми бактериями спирта и уксусной кислоты в зависимости от pH и других условий среды. Микробиология, VI, 468, 1937.
4. Зайцев А. Н. Значение активной кислотности среды для ацетоно-этилового брожения. Микробиология, VIII, 584, 1939.
5. Иерусалимский Н. Д. Связь между кислотообразованием и развитием уксуснокислых бактерий. Микробиология, VIII, 160, 1939.
6. Иерусалимский Н. Д. и Семенова В. А. Исследование по физиологии обмена веществ Cl. Acetobutylicum. III. Использование двухфазности брожения для переработки трудносбраживаемого сырья (мелассы). Микробиология, XIII, 116, 1944.
7. Мантейфель А. Я. Сравнительная характеристика возбудителя маслянокислого и ацетонобутилового брожения. Микробиология, VIII, 1096, 1939.
8. Мантейфель А. Я. Спорообразование у бактерий. II. Выяснение условий спорообразования у ацетоноэтиловых бактерий. Микробиология IX, 89, 1940.
9. Орлова Н. В. Образование ацетона и 2,3-бутиленгликоля культурой Aerobacter aerogenes. Микробиология, XVIII, 432, 1949.
10. Первозванский В. В., Шапиро Л. М. Получение 2,3-бутиленгликоля путем брожения. Сб. работ Научно-исслед. ин-та пищевой промышленности БССР, № 9, 1941.
11. Шапошников В. Н. Задачи микробиологии в интенсификации бродильных производств. Микробиология, VIII, 277, 1939.
12. Шапошников В. Н. Техническая микробиология, Изд. «Советская наука». Москва, стр. 22, 1948.
13. Шапошников В. Н., Мантейфель А. Я., Иерусалимский Н. Д., Зыкова К. И. и Бехтерева М. Н. Ацетонобутиловое брожение на мелассе. Микробиология, VIII, 38, 1939.
14. Шен М. М. Проблема брожения. Гостехиздат. Ленинград, стр. 113, 1928.
15. Adams G. A. and Stanier R. J. Production and properties of 2,3-butanediol. Can. J. Res., 23, Sec. B, p. 1, 1945.
16. Mickelson M. and Werkman C. H. Influence of pH on the dissimilation of glucose by Aerobacter indologenes. J. Bact., 36, 67, 1938.
17. Silverman M., Werkman C. H. The formation of acetylmethylcarbinol from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation. J. Biol. Chem., 138, 35, 1941.
18. Walpole G. S. The action of Bacillus lactis aerogenes of glucose and mannitol Proc. Roy. Soc., London, Sec. B, 83, 272, 1911.

СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СОЛЕЙ НАТРИЯ

М. Я. Калюжный

В предыдущих работах [7, 8] мы подвергли изучению вопрос об обезвоживании дрожжей растворами солей и о влиянии этого обезвоживания на некоторые их свойства. Так как вода в клетках находится в свободном и связанном состоянии, то интересно было выяснить состояние воды в клетках и свойства дрожжей, выращенных на средах с различным содержанием солей.

Исследования Селибер и Кацнельсон [18, 19, 20, 21, 22] показали, что среды с повышенным осмотическим показателем изменяют отношение между содержанием в клетках воды и сухого вещества в сторону увеличения последнего. Вопрос о том, насколько может уменьшаться содержание воды в клетках при размножении их на концентрированных средах и за счет какой части воды, свободной или связанной, происходит ее уменьшение, в литературе в должной мере не изучен.

Из ряда работ известно, что с повышением концентрации солей и других веществ в средах рост микроорганизмов замедляется, а в насыщенных растворах и совсем останавливается. Рубенчик и Гальперин [17] и Логинова [10], выращивая дрожжи на пивном сусле с прибавлением NaCl, нашли, что дрожжи могут размножаться при 10% этой соли. Горовиц-Власова, Ровенская и Глуховцев [1] описали расы дрожжей, которые сбраживали глюкозу в бульоне с NaCl до 20%. А развитие бактериальных видов Думеш [5], Дианова и Ворошилова [3] и Знаменский [6] наблюдали на средах с 20 и 30% NaCl. То же можно сказать и о других веществах, прибавленных в среды. Так, Селибер и Кацнельсон [23] показали, что дрожжи могут развиваться в среде с 60% сахарозы. В обзоре работ, приводимых Рихтером [16] и Коллегорской [8], различные авторы наблюдали развитие плесени на средах с прибавлением сахарозы от 50 до 110 г на 100 мл среды.

Этот далеко не полный перечень фактов показывает, что плесени, дрожжи и бактерии обладают большой способностью приспособления к меняющимся осмотическим условиям и, следовательно, к изменению воды в клетках при их развитии. Наряду с этим следует отметить, что микроорганизмы развиваются в средах с высоким содержанием тех веществ, которые являются субстратом биохимических процессов и потребляются клетками при их развитии. Когда же прибавленное вещество действует как осмотически активный агент и не используется на построение клеток, то при высоких концентрациях его рост микробов затрудняется.

Действие осмотических веществ сказывается не только в обезвоживании клеток, но и вызывает физиологические изменения в них. Так, Львов и Фихтенгольц [11] нашли, что под влиянием обезвоживания, так же как и при охлаждении, в тканях листьев табака наступает гидролиз крахмала и образование сахарозы. Расчеты авторов показали, однако, что осмотическое давление, создаваемое в клетках за счет образовавшейся сахарозы, увеличивается незначительно. Исследования Сисакяна и сотрудников [24, 25, 26] показали, что различные осмотиче-

ские концентрации меняют направленность ферментативных процессов и влияют на адсорбцию инвертазы в клетках.

При повышении осмотического давления при помощи многоатомных спиртов до нормальных пределов активируется синтетическая способность инвертазы, а при дальнейшем повышении осмотического давления до такого предела, когда оно становится обезвоживающим фактором, усиливаются гидролитические процессы. При осмотических концентрациях, вызывающих плазмолиз клеток, подавляются как синтетические, так и гидролитические процессы.

Из этого следует, что если гидролитические процессы клетки связаны с потерей осмотически подвижной (свободной) воды, то синтетические процессы ее, наоборот, сопровождаются поглощением свободной воды. Особенно поглощение воды усиливается протоплазмой клеток под действием на них ростовых веществ — ауксинов [12, 13]. Оценивая эти и ряд других фактов, Максимов считает, что уравнение осмотических соотношений клетки, выражаемое формулой $SP = OP - WP$ (т. е. сосущая сила клетки равна осмотическому давлению клеточного сока минус противодавление клеточной оболочки), должно быть заменено новым уравнением, а именно

$$SP = [OP + AP] - WP,$$

т. е., что сосущая сила клетки определяется суммой осмотического давления клеточного сока и активного давления протоплазмы минус противодавление клеточной оболочки.

Таким образом, изменение содержания воды в растительных клетках происходит не только под влиянием осмотического градиента, обусловленного разностью в концентрации веществ внутри и снаружи клетки, но и под влиянием активного поглощения воды протоплазмой. Чтобы убедиться, за счет какой части воды, свободной или связанной, происходят эти изменения в клетках при выращивании их на различных средах, и были предприняты настоящие исследования.

Экспериментальная часть

Для опытов брались дрожжи Saccharomyces cerevisiae XII раса, которые выращивались на синтетической среде и пивном сусле 8° по Балг. Синтетическая среда имела следующий состав: Na_2HPO_4 — 1,0 г; KCl — 0,5 г; $CaCl_2$ — 0,1 г; $MgSO_4$ — 0,3 г; пептона — 5,0 г; сахарозы — 50,0 г и дистиллированной воды — до 1000 мл. К средам прибавлялись: NaCl, $NaNO_3$ и Na_2SO_4 в количествах: 1%, 3% и 5%. Контролем служили среды без солей. Засев двухсуточной культуры производился в 100 мл среды, разлитой в колбы Виноградского. Выращивание производилось при 28° в течение 4 суток. Урожай отфильтрованных дрожжей взвешивался и подвергался анализу на сухое вещество, азот, число клеток в 1 г прессованных дрожжей, на содержание свободной и связанной воды в клетках и ее кислотности. В дрожжах, выращенных на сусле, кроме указанного, испытывалась бродильная энергия и подъемная сила.

Размножение дрожжей на синтетической среде

Влияние на дрожжи прибавленных солей сказывалось в замедлении их роста, который, судя по осадку на вторые сутки, можно выразить следующим образом:

Синтетическая среда	Среда + 1% соли	Среда + 3% соли	Среда + 5% соли
Сплошной осадок	Рост хорошо заметный	Рост едва заметный	Рост отсутствует

Угнетающее действие 5% концентрации Na_2SO_4 отличалось от такового для других солей еще тем, что дрожжи размножались в жидкой среде отдельными колониями. Под микроскопом дрожжи были меньшего размера, склеенными. Другие соли этой концентрации давали пылевидный осадок. Аналитические данные дрожжей, выращенных на синтетической среде (табл. 1), показывают, что с прибавлением солей в среду содержание воды в клетках падает, а сухое вещество возрастает по мере возрастания концентрации солей. Содержание азота в сухих навесках дрожжей различно для различных концентраций солей. Минимальное количество азота содержат дрожжи на среде с 1% NaCl, 3% $NaNO_3$ и 5% Na_2SO_4. Для последней соли азот в дрожжах находится в обратной зависимости от ее концентрации. Во всех вариантах размножения максимум образования сухой массы дрожжей дала не контрольная среда, а среда с солями.

Таблица 1

Сухое вещество и азот дрожжей, выращенных на синтетической среде с различным количеством солей натрия

№ опыта	Содержание солей в среде в %	Сухое вещество дрожжей в %	Содержание азота в сухой навеске дрожжей в %	Урожай сухой массы дрожжей в г на 700 мл среды
1	Среда — контроль	25,56	5,54	1,47
	„ + 1% NaCl	30,26	5,23	1,57
	„ + 3% „	36,71	5,40	1,22
	„ + 5% „	38,90	6,56	0,77
2	Среда — контроль	24,74	6,54	1,36
	„ + 1% $NaNO_2$	28,57	5,98	1,59
	„ + 3% „	33,47	5,29	1,61
	„ + 5% „	36,03	5,98	1,33
3	Среда — контроль	25,48	6,70	1,27
	„ + 1% Na_2SO_4	—	6,30	—
	„ + 3% „	28,29	6,10	1,47
	„ + 5% „	32,83	6,03	1,45

Размножение дрожжей на солодовом сусле

Соли, прибавленные в сусло, первые дни также производили угнетающее действие на размножение дрожжей. Для NaCl это действие возрастало по мере увеличения концентрации соли. Несмотря на это, в опытах без продувания среды воздухом урожай сухой массы дрожжей нами был получен на сусле с 1 и 2% NaCl больший, чем на сусле без соли.

В опытах с продуванием максимум накопления сухого вещества дрожжей был получен на сусле без солей, что видно из табл. 2.

К сожалению, в опытах с продуванием нами не испытано размножение на сусле с 1 и 2% NaCl. Возможно, что максимальный урожай нами был бы получен на сусле с 2% NaCl, так как в опыте с продуванием контрольного сусла и сусла с 3% NaCl получился урожай в 1,5 раза больший, чем в опыте без продувания. Что касается влияния солей на содержание воды в клетках, то данные табл. 2 подтверждают ту же зависимость, а именно: содержание воды уменьшается, а сухое вещество дрожжей возрастает с количеством прибавленной в среду соли.

Таблица 2

Сухое вещество и азот дрожжей, выращенных на солодовом сусле с солями натрия

Условия опытов	% соли в среде	Сухое вещество дрожжей в %	Азот в сухой навеске дрожжей в %	Урожай сухой массы в г на 1 л среды
Без продувания	Сусло	20,46	7,48	2,98
	» + 1% NaCl	26,44	7,03	3,04
	» + 2% »	33,55	7,97	3,69
	» + 3% »	35,85	8,03	2,40
С продуванием воздуха	Сусло	21,27	7,12	4,61
	» + 3% NaCl	35,10	7,85	3,59
	»	20,45	7,95	4,10
	+ 3% $NaNO_3$	31,19	8,57	3,56
	»	20,70	7,72	4,80
	» + 3% Na_2SO_4	28,80	8,22	3,75

Содержание азота оказалось больше в дрожжах, полученных на сусле с 3% солей натрия.

Состояние воды в дрожжевых клетках, выращенных на различных средах

О состоянии воды в клетках мы судили, с одной стороны, по высушиванию дрожжей при 105° до постоянного веса и, с другой,— по отнятию воды из навесок дрожжей таким количеством поваренной соли, которым полностью отнималась из клеток осмотически подвижная вода. Измерения этой воды проводились после отделения ее от дрожжей на бюхнеровской воронке при остаточном давлении 120 мм ртутного столба. Связанная вода в клетках находилась путем вычитания свободной воды от всей воды, удаляемой из дрожжей высушиванием. Опыты проводились с прессованными маточными дрожжами с дрожжевого завода, выращенными на мелассе, и с дрожжами, выращенными на сусле с различным количеством NaCl. Результаты этих определений сведены в табл. 3.

Таблица 3

Состояние воды в дрожжах, выращенных на различных средах

Раса дрожжей	Среда	Сухое вещество в навеске 100 г в г	Количество удаленной воды в %: высушиванием при 105°	Количество удаленной воды в %: плазмолизом свободная вода	Связанной воды в % к навеске	Отношение свободной воды к сухому веществу	Отношение связанной воды к сухому веществу
XII раса	Мелласса	25,38	74,62	53,33	21,29	2,10	0,84
	»	25,43	74,52	50,00	24,52	1,96	0,96
	»	25,34	74,66	50,00	24,66	1,97	0,96
XII раса	Сусло 8° Балг.	22,53	77,47	53,00	24,47	2,35	1,08
	То же + 1%	25,72	74,28	48,50	25,78	1,87	1,00
	» » + 3%	35,00	65,00	36,00	29,00	1,03	0,83

Из приведенных данных видно, что в маточных дрожжах 50% веса составляет свободная вода клеток и что 23,5% воды от веса клеток находится в связанном состоянии. Округляя эти цифры, можно сказать, что в прессованных маточных дрожжах свободная вода клеток относится к сухому веществу их, как 2 : 1, а связанная вода — как 1 : 1. Иные

отношения свободной и связанной воды наблюдаются у дрожжей, выращенных на сусле с добавлением солей натрия.

Приведенные данные показывают, что увеличение сухого вещества клеток и уменьшение воды в них идут главным образом за счет осмотически подвижной ее части. Эти изменения находятся в прямой зависимости от содержания NaCl в среде. Содержание связанной воды в клетках возрастает по отношению к свободной воде и падает по отношению к сухому веществу, но не в такой мере, как падает свободная вода. С уменьшением объема отнятой из клеток воды увеличивается ее кислотность, что указывает, что в меньшем объеме свободной воды клетки заключается больше растворимых веществ, участвующих в поддержании осмотического состояния клетки.

Возможно, что повышенная кислотность клеточного сока влияет на процесс роста. Концентрация среды действует, повидимому, уплотняющим образом на протоплазменную массу клетки и ее структуру, так как изменение отношения воды к сухому веществу ведет к увеличению удельного веса клетки. Здесь отметим, что об увеличении веса клеток под влиянием концентрации среды приводятся многочисленные данные в упомянутых выше работах Селибера и Кацнельсон. Это подтверждается и данными, приведенными в табл. 4.

Таблица 4

Вес дрожжей в зависимости от концентрации среды

Среда	Клеток в 1 г дрожжей в млрд.	Сухой вес дрожжей в %	Относит. вес сухого вещества равного числа клеток в 1 г	Относит. вес сухого вещества 1 дрожж. клетки
Сусло 8° Балг. . . .	7,340	22,53	22,53	1,000
То же + 1% NaCl	7,890	25,72	23,92	1,061
„ „ + 3% „	9,275	35,00	27,66	1,227

Сбраживание древесного гидролизата в цилиндрах навесками (0,5%) этих дрожжей действительно подтвердило различие в удельном весе клеток, так как оседание началось с дрожжей, выращенных с 3% NaCl. Через 15 часов основная масса этих дрожжей была в осадке. Дрожжи, выращенные с 1% соли, осели через 36 часов, а цилиндр с контрольными дрожжами оставался еще мутным и после трехсуточного стояния.

За 18 часов сброжено дрожжами сахара древесного гидролизата: из гидролизата без солей — 1,59%; из гидролизата с 1% соли — 2,28% и из гидролизата с 3% соли — 2,23%. Таким образом, опыты показывают, что концентрация осмотически деятельных веществ в среде является фактором, определяющим организацию дрожжевых клеток, их свойства и активность сбраживать сахар. С повышением концентрации среды объем свободной воды в клетках сокращается до такого минимума, при котором рост клеток затрудняется. Этим, повидимому, обусловлен предел развития микроорганизмов в концентрированных растворах. Как видно из цитированной литературы, верхний предел для развития в концентрированных средах различен для различных микроорганизмов. Одни виды предпочитают среду с такой концентрацией, при которой другие погибают. На основании работ Мишустина и Мессиневой [14, 15] по определению внутриклеточного давления можно заключить, что содержание свободной воды в клетках для отдельных видов изменяется в связи с климатическими условиями.

Определение осмотического давления содержимого дрожжевой клетки

Так как по ряду исследований [2, 4] связанная вода клеток не является растворителем, то, следовательно, концентрация веществ в клеточном соке определяется наличием в клетке свободной воды. Приведенные выше опыты показали, что регулирование тургорного состояния у дрожжей, выращенных на концентрированных средах, достигается в основном за счет уменьшения количества свободной воды и эластичности клеточной оболочки, так как явления плазмолиза у клеток не наблюдались.

Это обстоятельство в прежних работах по изучению внутриклеточного давления не принималось во внимание. Вследствие этого для осмотического давления растворяемых веществ в клетках получались преувеличенные цифры.

Ясно, что при погружении клеток в плазмолизирующий раствор отнятая вода увеличивает объем раствора и этим разбавляет его исходную концентрацию. В то же время концентрация клеточного сока, благодаря потере воды клеткой приобретает более высокий осмотический показатель. Так как нам известен начальный объем раствора и его концентрация, то измерение объема раствора после плазмолиза клеток позволит установить новую концентрацию, выражающую наступившее равновесие внутри и снаружи клетки. Выразим это равновесие через показатель изотонической концентрации a; он будет равен $a = \frac{m\ 100}{v + \Delta v}$ где v — начальный объем раствора, m — масса вещества (плазмолитика) в граммах, Δv — приращение объема после плазмолиза клетки. Таким образом, в отличие от изотонической концентрации, которая устанавливается по де Фризу, а также вычисляется по Гефлеру, показатель изотонической концентрации выражает не начальную концентрацию клеточного сока, а ту, которая наступила в результате отнятия воды из клетки, независимо от микроскопически наблюдаемого изменения в последней.

Все это показывает, что для определения концентрации клеточного сока дрожжей практически необходимо знать объем свободной воды в клетке до плазмолиза и объем после плазмолиза. Тогда искомую концентрацию клеточного содержимого математически можно выразить следующим образом: предположим, что в клетке или в некоторой навеске прессованных дрожжей на b миллилитров воды содержится c граммов растворимых веществ.

Тогда концентрация клеточного сока a_0 будет

$$a_0 = \frac{c}{b}. \qquad (1)$$

Если от навески дрожжей отнимается Δb миллилитров, то новая концентрация будет

$$a_1 = \frac{c}{b - \Delta b}. \qquad (2)$$

Как уже известно, концентрация окружающего раствора после плазмолиза и наступления равновесия равна показателю изотонической концентрации, а именно

$$a = \frac{m\ 100}{v + \Delta v}. \qquad (3)$$

Так как в этом случае $a = a_1$, то, следовательно,

$$\frac{c}{b - \Delta b} = \frac{m\ 100}{v + \Delta v}. \qquad (4)$$

Из последнего выражения следует, что

$$c = \frac{m\,100}{v + \Delta v}(b - \Delta b). \qquad (5)$$

Заменяя в формуле (1) c его значением, получим формулу вычисления начальной концентрации клеточного сока

$$a_0 = \frac{m\,100\,(b - \Delta b)}{(v + \Delta v)\,b}, \qquad (6)$$

где v — объем раствора (в мл) взятого плазмолиза и содержащего m граммов плазмолитика, $\Delta v = \Delta b$ — объем отнятой воды из навески дрожжей в миллилитрах, b — начальный объем свободной воды в навеске дрожжей, $(b - \Delta b)$ — объем оставшейся воды в навеске после плазмолиза.

Величину a_0 можно также вычислить с помощью показателя изотонической концентрации. Тогда формула (6) примет следующий вид:

$$a_0 = a\frac{b - \Delta b}{b}. \qquad (7)$$

Следовательно, начальная концентрация клеточного сока дрожжевой клетки равна показателю изотонической концентрации, умноженному на отношение оставшегося объема воды в клетке после плазмолиза к объему ее до плазмолиза.

В формулах (6) и (7) неизвестными являются величины b и $(b - \Delta b)$, т. е. начальный объем свободной воды в навеске и оставшийся ее объем после плазмолиза.

Так как $\Delta b = \Delta v$, то $(b - \Delta b)$ получается путем вычисления. Следовательно, при определении концентрации клеточного сока в клетках определенной навески дрожжей экспериментально необходимо определить b и Δb, т. е. содержание воды в клетке до плазмолиза и отнятое ее количество после плазмолиза.

Для определения концентрации клеточного сока мы пользовались прессованными маточными дрожжами, которые подвергались плазмолизу различными объемами раствора NaCl с различной концентрацией. Объем свободной воды в клетках определялся путем плазмолиза дрожжей поваренной солью в кристаллическом виде. Общая влажность дрожжей определялась высушиванием их при 105° до постоянного веса. Плазмолизу подвергались навески в 40 г дрожжей. Содержание влаги в них 29,7 мл. Осмотически подвижной воды — 21,3 мл.

Результаты определения осмотического давления клеточного сока приведены в табл. 5.

Таблица 5

Определение осмотического давления дрожжей клетки по формуле (6)

Раствор NaCl в % (в г)	Объем раствора до плазмолиза в мл	Объем раствора после плазмолиза в мл	Осталось свободной воды в навесках после плазмолиза в мм	Концентрация клеточного сока в %
2,92 (1,18)	40,0	45,0	16,3	2,00
4,0 (0,8)	20,0	26,5	14,8	2,09
4,0 (1,6)	40,0	48,4	12,9	2,00
10 (2,0)	20,0	34,0	7,3	2,01

Приведенные данные показывают, что из равных навесок дрожжей отнимается различное количество свободной воды, а именно 5 мл пер-

вым раствором и 14 мл — последним. Это отнятие воды находится в зависимости как от объема, так и от концентрации раствора NaCl.

Сравнивая величины, характеризующие концентрацию клеточного сока, полученные при вычислении по предлагаемой формуле, мы видим, что, независимо от концентрации плазмолизирующего раствора, концентрация клеточного сока остается довольно постоянной и равна 2% NaCl. Имеющиеся незначительные отклонения скорее следует отнести за счет погрешности определения. Совсем другое получается, если при определении по предлагаемому методу принимать во внимание всю воду в клетке и свободную и связанную вместе. При этом с повышением концентрации раствора повышается также величина, характеризующая концентрацию клеточного сока. Мы видим, таким образом, что для определения внутриклеточного давления дрожжевой клетки следует принимать во внимание осмотически подвижную или свободную воду клетки.

Бродильная энергия и подъемная сила дрожжей, выращенных на сусле с различным количеством солей натрия

Бродильная энергия дрожжей нами учитывалась по убыли CO_2 при сбраживании равными навесками (0,5 г) дрожжей 10% раствора сахарозы при 30° в течение 24 часов. Результаты этих испытаний приводятся в табл. 6.

Таблица 6

Бродильная энергия дрожжей, выращенных на сусле с различным количеством солей натрия

№ опыта	Среда, на которой выращены дрожжи	Убыль CO_2 в г		
		за 6 час.	за 18 час.	всего за 24 часа
1	Сусло	0,18	0,46	0,64
	„ + 1% NaCl . . .	0,19	0,61	0,80
	„ + 2% „ . . .	0,20	0,63	0,83
	„ + 3% „ . . .	0,19	0,60	0,79
2	„	0,23	0,91	1,14
	„ + 3% NaCl . . .	0,31	1,10	1,41
3	„	0,07	0,44	0,51
	„ + 3% $NaNO_3$ . .	0,07	0,75	0,82
4	„	0,12	0,55	0,67
	„ + 3% Na_2SO_4 . .	0,14	0,65	0,79

Из таблицы видно, что дрожжи, выращенные на среде с прибавлением солей натрия, обладают лучшей бродильной энергией, чем дрожжи, выращенные на контрольной среде без солей. Повышенная бродильная энергия у опытных дрожжей, на наш взгляд, зависит от различного содержания в навесках сухого вещества дрожжей.

Подъемная сила дрожжей испытывалась путем введения 2 г дрожжей в 100 г пшеничной муки при замешивании ее с 60 мл дистиллированной воды. Перед замешиванием дрожжи опускались в воду, куда также прибавлялось 1,5 г поваренной соли. После равномерного замешивания теста в батарейных стаканах отмечалась его высота и стаканы ставились в термостаты при 32°. В опытах учитывалось время, пошедшее на подъем теста в стаканах до двойного увеличения объема.

Данные этих опытов приводятся в табл. 7.

Таблица 7

Подъемная сила дрожжей, выращенных на сусле с различным количеством солей натрия

№ опыта	Среда, где выращивались дрожжи	Время, потраченное на двойное увеличение теста, в мин.	Время хранения дрожжей до опытов при 12°, в сутках
1	Сусло солодовое	150	
	То же + 1% NaCl	125	3
	„ „ + 2% „	100	
	„ „ + 3% „	110	
2	„ „	200	7
	„ „ + 3% $NaNO_3$ . . .	155	
3	„ „	255	10
	„ „ + 3% Na_2SO_4 . . .	145	
4	„ „	215	3
	„ „ + 3% NaCl	130	

Из приведенных данных видно, что дрожжи, выращенные на сусле с солями, обладают большей подъемной силой, чем дрожжи, выращенные на контрольной среде. Более энергичными по подъемной силе оказались дрожжи, выращенные на сусле с 2% NaCl.

Выводы

При размножении дрожжей на средах с повышенным осмотическим показателем, созданным путем прибавления солей натрия, содержание воды в клетках уменьшается.

В маточных прессованных дрожжах свободная вода клеток относится к сухому веществу их, как 2 : 1, а связанная, как 1 : 1.

В дрожжах, выращенных на сусле 8° Балг., свободная вода клеток относится к их сухому веществу, как 2,35 : 1, а связанная, как 1,08 : 1.

В дрожжах, выращенных на сусле 8° Балг. + 3% NaCl, свободная вода клеток относится к сухому веществу, как 1,03 : 1, а связанная — как 0,83 : 1.

Уменьшение воды в клетках идет главным образом за счет осмотически подвижной ее части, в то время как количество неподвижной или связанной воды в клетках уменьшается незначительно.

Это дает основание утверждать, что тургорное состояние клеток в гипертонических растворах определяется в первую очередь содержанием свободной воды в клетках. Протоплазменная же масса при этом уплотняется, и это ведет к увеличению удельного веса клетки.

Дрожжи, выращенные на сусле с прибавлением солей натрия, обладают лучшей бродильной энергией и подъемной силой, чем дрожжи, выращенные на сусле без солей.

Измерение количества свободной воды в клетке послужило основанием для разработки метода определения осмотического давления дрожжевой клетки.

Государственный
естественно-научный институт
им. П. Ф. Лесгафта
Ленинград

Получено 5.VIII.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Горовиц-Власова Л. М., Ровенская Э. М. и Глуховцев Б. М. К вопросу об осмофильных дрожжах. Тр. Всесоюзного н.-иссл. ин-та пищевой промышленности. СССР, 3, вып. 3, 1935.
2. Гортнер Р. Основы биохимии. Коллоиды. Снабтехиздат, стр. 173, 1933.

3. Дианова Е. В. и Ворошилова А. А. Солевой состав среды и специфичность морских бактерий. Микробиология, IV, вып. 3, 1935.
4. Думанский А. В. Учение о коллоидах. ОНТИ, 1935.
5. Думеш М. Г. О галофилии и солетолерантности бактерий. Микробиология, IV, вып. 1, 1935.
6. Знаменский Г. А. Влияние концентрированных растворов NaCl на резистентность, диссоциацию и цикл развития паратифа В. Шотмюллера, Журн. микробиол., эпидем. и иммунобиол., 9, вып. 3, 1932.
7. Калюжный М. Я. Отнятие воды при плазмолизе дрожжей и определение осмотического давления. Изв. Научного ин-та им. Лесгафта, 20, вып. 3, 1937.
8. Калюжный М. Я. Влияние обезвоживания дрожжей растворами солей на их свойства. Микробиология XIX, 217, 1950.
9. Коллегорская Е. М. Рост и жизнедеятельность некоторых дрожжей в зависимости от концентрации раствора, Изв. СПб. биол. лаб., 12, вып. 1, 1912.
10. Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Влияние величины популяции на скорость селекции у дрожжей. Микробиология, XV, вып. 5, 1946.
11. Львов С. Д. и Фихтенгольц С. С. К вопросу о биохимических основах засухоустойчивости. Экспериментальная ботаника, вып. 2, серия 4, 1936.
12. Максимов Н. А. Ростовые вещества, природа их действия и практическое применение. Успехи соврем. биол., 22, вып. 2 (5), 1946.
13. Максимов Н. А. О механизме действия ростовых веществ на растительные клетки. Бюлл. Моск. об-ва испыт. природы, Отд. биол., нов. сер. 51, вып. 2, 1946.
14. Мишустин Е. Н. и Мессинева М. А. Осмотическое давление в клетке почвенных микробов в связи с их приспособлением к климату. Микробиология, II, вып 1, 1933.
15. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. Изд. АН СССР, 1937.
16. Рихтер А. А. Об одном осмофильном организме, дрожжевом грибке. Изв. СПб. биол. лаб., 9, 1910.
17. Рубенчик Л. И. и Гальперин М. В. Влияние хлористого натрия на размножение хлебопекарных дрожжей. Микробиология, IV, вып. 1, 1935.
18. Селибер Г. Л. О влиянии условий культивирования дрожжей на их бродильную способность и другие свойства. Пищевая промышленность СССР, № 10, 1930.
19. Селибер Г. Л. и Кацнельсон Р. С. К вопросу об определении осмотического значения дрожжевой клетки. Изв. Научн. ин-та им. Лесгафта, 14, стр. 39, 1928.
20. Селибер Г. Л. Об определении осмотического значения дрожжевой клетки. Изв. Научн. ин-та им. Лесгафта, 20, вып. 3, 1937.
21. Селибер Г. Л. и Кацнельсон Р. С. Плазмолиз как средство обезвоживания и консервирования дрожжей. Микробиология, I, вып. 3, 1932.
22. Селибер Г. Л. и Кацнельсон Р. С. Осмотическое значение дрожжевой клетки у различных дрожжей в связи с изменением концентрации сахара среды. Изв. Научн. ин-та им. Лесгафта, 17—18, 1934.
23. Селибер Г. Л. и Кацнельсон Р. С. Der Einfluss der Zusammensetzung des Nährbodens auf das Gewicht und den Osmotischen Wert der Hefezelle. Protoplasma, 7, H. 2, 1929.
24. Сисакян Н. М. Биохимическая характеристика засухоустойчивых растений. Изд. АН СССР, 1946.
25. Сисакян Н. М. и Кобякова А. М. Значение осмотического фактора в изменении направленности действия ферментов в живой растительной клетке. Биохимия, 9, вып. 2—3, 1944.
26. Сисакян Н. М. и Кобякова А. М. Влияние осмотической концентрации на адсорбцию и элюцию инвертазы тканями высших растений. Биохимия, 12, вып. 1, 1947

АНАЭРОБНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ЛЬНЯНОЙ МОЧИЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ПУТИ ЕЕ УСКОРЕНИЯ

А. Л. Бычковская

В предыдущей работе [1] сообщалось, что регенерация льняной мочильной жидкости в высоком слое может осуществляться комплексом аэробных микроорганизмов, способных сжигать летучие жирные кислоты до углекислоты. Раскисление мочильной жидкости проводится этими микроорганизмами последовательно от верхних слоев к нижним, в силу чего между скоростью подобной регенерации и глубиной регенерируемого слоя существует обратная зависимость. Между тем регенерационная установка со значительной глубиной представляет с технологической точки зрения определенные преимущества. На теоретическую возможность анаэробной регенерации указывал еще в 1931 г. Минервин [2]. Проведенные им лабораторные и полузаводские испытания дали положительные результаты [3] и были впоследствии успешно продолжены [4]. До сих пор, однако, нет исследований ни о возбудителях процесса анаэробной регенерации, ни о путях возможного его ускорения. Этих вопросов касается настоящая статья.

Опыты проводились в высоких цилиндрах и сосудах Фрибеса. Анаэробное брожение отработанной льняной мочильной жидкости получалось при заражении ее образцами ила, взятыми из заводского регенератора (Лихославль) или со дна колхозных мочил. Сосуды, в которых возникало анаэробное брожение, отличались обильным газовыделением, специфическим запахом и цветом. Анализы показали, что в этих сосудах, в отличие от вариантов без ила, pH было одинаковым по всей толще жидкости. Процесс возникал также при перенесении части осадка из отбродившего материала в новые сосуды с кислой жидкостью. Однако последующая работа сильно тормозилась длительными сроками, протекавшими от момента заражения жидкости до появления значительного газовыделения. Поэтому в дальнейшем внимание было направлено на отыскание химических соединений, способных дать значительное ускорение процесса. Опыты по выявлению потребности в дополнительном органическом и минеральном азоте, нейтрализующих веществах и так называемых ростовых веществах обнаружили весьма отчетливо, что для ускорения брожения фактор нейтрализации является решающим. Так, при оптимальной дозировке $NaHCO_3$ в 0,25% брожение вместо 12-го дня возникало на 4-й. Эти данные легли в основу дальнейшей работы.

Изучение анаэробной регенерации в присутствии нейтрализующих соединений выявило следующую закономерность: в то время как количество органических веществ, окисляемых перманганатом (по Кубелю), сильнее снижалось в нейтрализованных вариантах, содержание летучих кислот в этих же вариантах хотя и снижалось, но оставалось более высоким, чем в контроле (рис. 1).

Предположение о том, что быстро достигаемый в этих условиях высокий уровень pH сам по себе действует тормозящим образом на дальнейший ход процесса, не подтвердилось. Повышенное (по сравнению с контролем) содержание летучих кислот в подщелоченных вариантах можно было констатировать до того, как pH жидкости достигало значений выше 8,0. Предположение о резко подщелачивающем действии карбонатных солей также не подтвердилось, в вариантах с NaOH ход

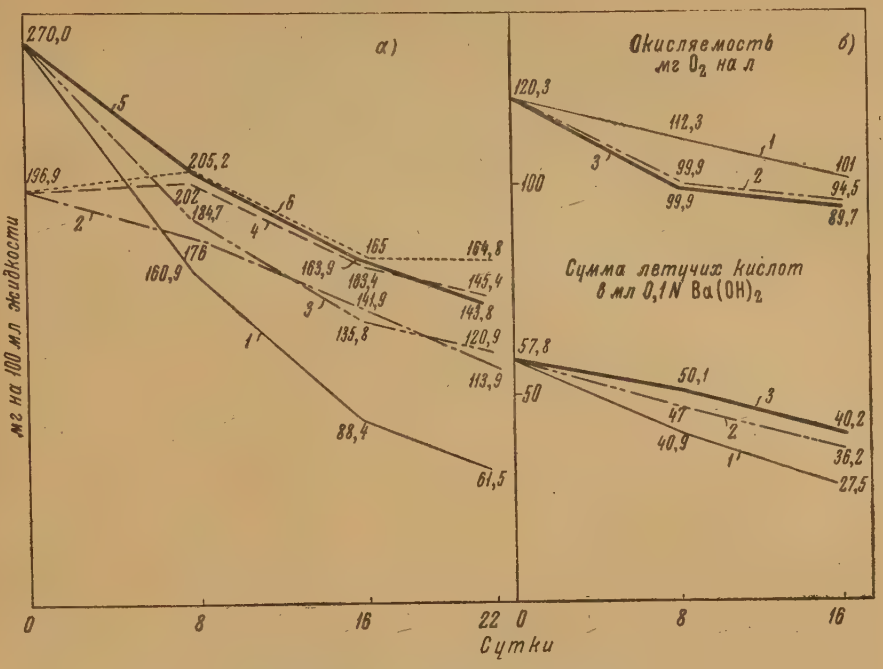


Рис. 1. Анаэробная регенерация с нейтрализаторами

а. 1 — уксусная, контроль; *2* — масляная, контроль; *3* — уксусная, NaOH; *4* — масляная, NaOH; *б* — уксусная, $NaHCO_3$; *6* — масляная, $NaHCO_3$. *б. 1* — контроль; *2* — NaOH, *3* — $NaHCO_3$

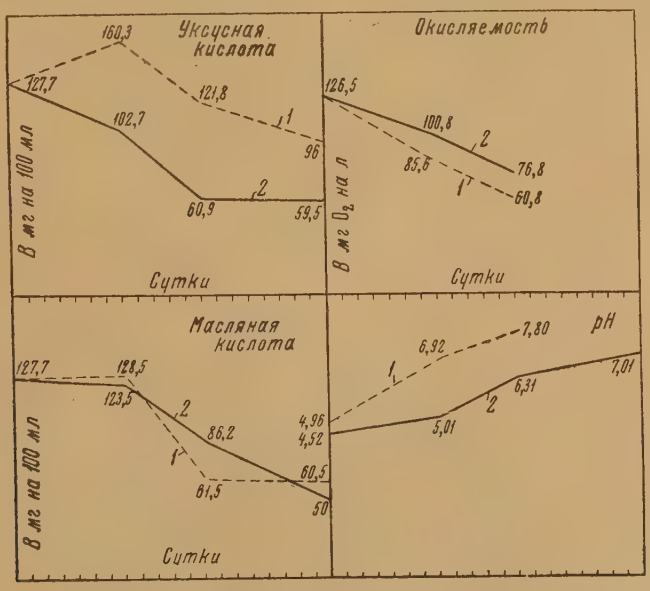


Рис. 2. Анаэробная регенерация с мелом

1 — $CaCO_3$; *2* — контроль

брожения оставался таким же, как и с углекислыми солями. Некоторое объяснение обнаруженной закономерности дало более детальное изучение динамики образования летучих кислот. В ряде случаев было обнаружено, что уже в начальный период брожения количество летучих кислот, и особенно уксусной, в подщелоченных вариантах не только выше, нежели в контрольных, но выше исходного содержания их в жидкости (рис. 2). Очевидно, в отработанной мочильной жидкости имеются слож-

ные органические соединения, способные при дальнейшем распаде явиться источником вторичного образования кислот. Более энергичное разрушение сложного органического вещества в нейтрализованной жидкости отражено более быстрым падением окисляемости. Несоответствие же между ходом кривых окисляемости и ходом кислотных кривых указывает на то, что окисляемость жидкости перманганатом весьма мало обусловлена летучими жирными кислотами. На последнее имеются указания в литературе [7, 9].

Заслуживает внимания ход брожения в присутствии некоторых азотистых ускорителей (рис. 3). В качестве последних взяты были хло-

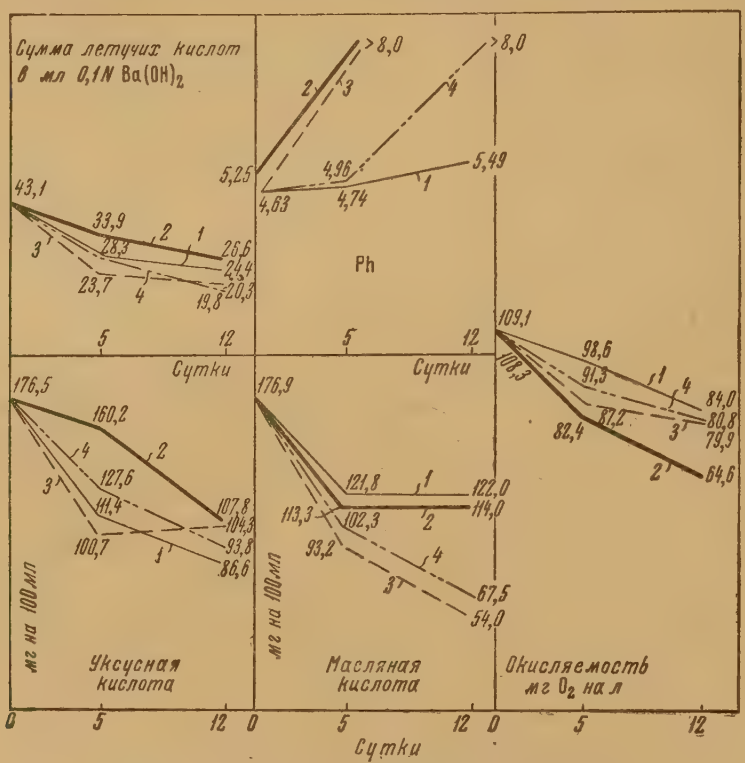


Рис. 3. Регенерация с азотистыми прибавками

1 — контроль; *2* — NaOH; *3* — мочевина; *4* — NH_4Cl

ристый аммоний и мочевина. Как показывают кривые, разрушение сложных органических веществ в присутствии этих соединений происходит значительно менее энергично, чем в варианте с безазотистым нейтрализатором (NaOH), разрушение же летучих кислот протекает, наоборот, гораздо более интенсивно. Особенно интересен факт более интенсивного разрушения масляной кислоты, обычно труднее поддающейся действию микроорганизмов.

Вопрос о возбудителях анаэробного процесса регенерации впервые поднят Минервиным [3]. Им высказано предположение, что этот процесс, по аналогии с биологической очисткой сточных вод в анаэробных условиях, является по существу метановым брожением органических кислот. Им же доказано постоянное наличие метана в смеси выделяющихся при анаэробной регенерации газов. Однако в отношении природы возбудителей никаких конкретных данных Минервин не приводит.

Систематическими наблюдениями удалось установить, что даже при интенсивно протекающем анаэробном брожении кислот возбудители его остаются локализованными на дне, в осадке бродящей жидкости, и

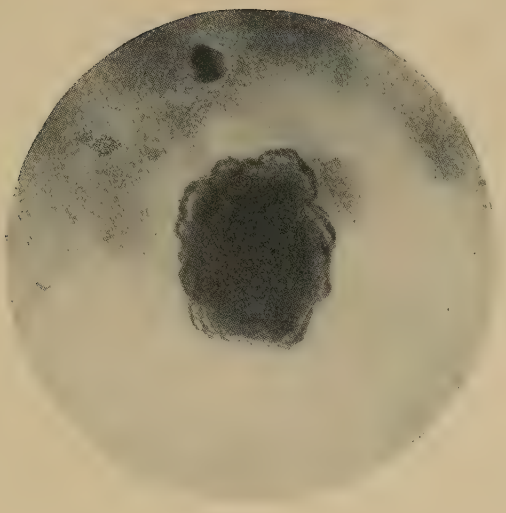


Рис. 4

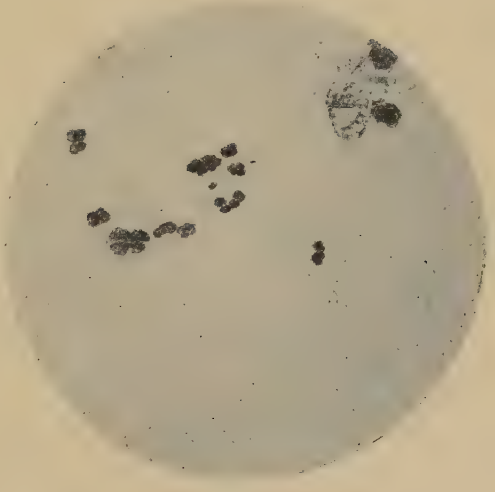


Рис. 5

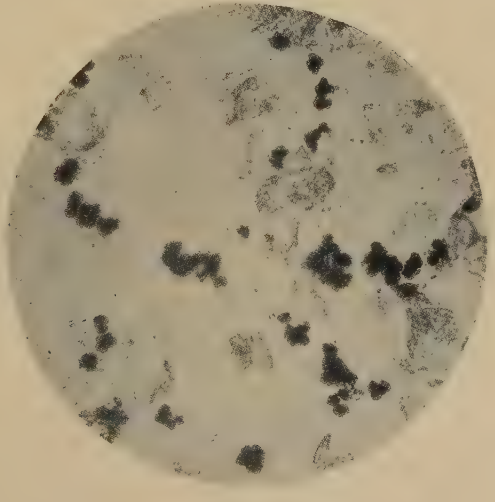


Рис. 6

лишь в незначительной степени обнаруживаются в вышележащих слоях. Вторая существенная особенность, связанная с первой, заключается в необходимости предоставления клеткам возбудителей какого-либо твердого в достаточной степени дисперсного субстрата — носителя. В качестве такого субстрата оказалась наиболее пригодной синевато-серая (Кембрийская) глина, являющаяся обычным грунтом колхозных мочил. Средой для получения обогащенных культур служила нейтрализованная мелом отработанная мочильная жидкость с добавлением 0,1% NH_4Cl. Среда разливалась высоким слоем, а на дно сосудов вносилась глина слоем до 1 см. Отбродившая жидкость сливалась и заменялась свежей. Достаточная степень обогащения получалась после 3—4-кратной смены среды. Для получения колоний взята была плотная среда, применявшаяся Barker [5] для изолирования возбудителей метанового брожения. Кроме минеральных солей и уксуснокислого калия, к среде прибавлялось 5% дрожжевого экстракта или вытяжки из солодовых ростков. Среда после засева либо засасывалась в узкие длинные трубки, либо оставлялась в обычных пробирках с залитыми парафином или смолкой пробками. Рост специфических организмов узнается сперва по разрыву среды, а позже по появлению беловатых или бледнооранжевых колоний. Пигментация колоний не всегда выражена и диагностическим признаком считаться не может. Колонии при малом увеличении обнаруживают крупнозернистое, часто мозаичное строение краев и плотную середину (рис. 4). В фиксированном препарате из колоний клетки имеют правильную шарообразную форму и соединены в характерные скопления, аналогичные пакетам сарцины (рис. 5). Для отсева колоний использована была та же жидкая среда, что и для получения обогащенных культур. Основным критерием развившейся культуры, помимо газовыделения, служила бактериоскопия глинистого осадка. В фиксированном препарате, окрашенном эритрозином, возбудители анаэробной регенерации легко узнаются благодаря расположению клеток в виде пакетов (рис. 6). Чистых культур получить не удалось. Наиболее постоянными спутниками были два: очень мелкий кокк и мелкая коккобактерия. По совокупности признаков полученные культуры идентичны анаэробной сарцине, впервые описанной Söhngen [5] и впоследствии получившей название Methanosarcina methanica [6]. Из особенностей метаносарцины необходимо отметить медленное и скудное накопление бактериальной массы в осадке бродящих культур. Во всех случаях, когда бактериоскопическое обследование указывает на интенсивное размножение и богатое накопление вышеописанных пакетов, не удается обнаружить обильного бактериального осадка.

Кислоторазрушающая активность полученных культур проверялась как на нейтрализованной мочильной жидкости, так и на искусственной среде с кальциевыми солями уксусной и масляной кислот (табл. 1).

Сбраживание кислот на искусственной среде выражено более резко, чем на мочильной жидкости. Объяснить это можно тем, что в первом случае кислоты являются единственным источником углерода, в мочильной же жидкости имеются и другие сложные органические соединения, способные в ходе брожения явиться не только источником углерода, но и источником дополнительного образования некоторого количества летучих кислот.

Анализ газов после 10-суточного брожения обогащенной культуры в нестерильной нейтрализованной мочильной жидкости обнаружил наличие 68,02% метана, 21,70% сероводорода и 10,2% углекислоты.

Полученные результаты подтверждают данные Минервина о наличии метанового брожения в анаэробной регенерации льняной мочильной жидкости и указывают на то, что анаэробная сарцина принимает активное участие в этом процессе.

Опыты по выяснению возможности ускорения анаэробного сбражи-

Таблица 1

Разрушение летучих кислот обогащенной культурой метаносарцины (штамп K_2)

Условия опыта	Уксусная кислота в мг на 100 мл				Масляная кислота в мг на 100 мл			
	исходное	через 5 суток	через 10 суток	сброжено в %	исходное	через 5 суток	через 10 суток	сброжено в %
Искусственная среда с Са-солями летучих кислот	229,1	99,7	22,2	90,3	229,7	119,7	66,8	70,9
Мочильная жидкость, нейтрализация мелом	155,8	110,2	48,9	68,7	107,71	88,4	58,8	45,4

вания кислот с помощью полученных обогащенных культур проводились в высоких цилиндрах и аквариумных банках. Результаты оказались довольно однотипными. Если обогащенная метанообразующая культура вносится в кислую отработанную мочильную жидкость, то брожение возникает спустя долгий «инкубационный» период, отмечавшийся многими авторами [5, 8] для метанового брожения. Внесение того же посевного материала в нейтрализованную жидкость дает резкое ускорение брожения. Если эффект от внесения свежего ила сравнивать с эффектом от внесения обогащенных культур, то определенную закономерность обнаружить не удается: в одних случаях ил активнее культуры, в других, наоборот, культура обгоняет ил. Но те варианты, где ил вносится совместно с культурой, дают постоянное ускорение процесса по всем показателям (табл. 2).

Таблица 2

Анаэробная регенерация в присутствии ила и метанообразующей культуры

Объект исследования	pH				Летучие кислоты в мг на 100 мл					
		через			уксусная			масляная		
	исходное	5 суток	7 суток	10 суток	исходное	через 10 суток	сброжено в %	исходное	через 10 суток	сброжено в %
Свежий ил . . .	4,45	4,9	5,3	7,0	127,4	63,4	50,2	127,7	89,8	29,6
Культура метаносарцины	4,45	5,5	6,1	6,5	127,4	63,1	50,4	127,7	101,2	20,7
Ил + культура . .	4,45	5,6	6,5	7,8	127,4	57,2	55,1	127,7	80,6	36,8
Культура + 0,5% $CaCO_3$	6,2	> 8,0	> 8,0	> 8,0	127,4	100,4	22,1	127,7	92,2	27,8

Внесение метанообразующих культур в нейтрализованную мочильную жидкость сопровождается теми же сдвигами в ходе брожения, что и внесение ила: наряду с усилением газовыделения увеличивается количество остаточных летучих кислот, при преобладании уксусной кислоты над масляной (нижний вариант табл. 2). Очевидно, и в этих условиях имеет место процесс вторичного образования кислот, о котором говорилось выше. Бактериоскопическая картина осадков из вариантов: ил + нейтрализующее соединение и обогащенная культура + нейтрализующее соединение поражает своим сходством.

Таким образом, в условиях нейтральной реакции в жидкости происходят два противоположно направленных процесса:

1) основной процесс разрушения кислот в результате интенсивного размножения клеток метаносарцины и

2) побочный процесс новообразования кислот из более сложных органических соединений.

Вопрос о том, какие именно компоненты микрофлоры участвуют в этом побочном процессе, сможет быть разрешен при изучении биохимизма чистых культур метаносарцины.

Практическое значение накопленного материала представляется в следующем виде.

Регенерация мочильной жидкости в высоком слое может протекать по двум типам — аэробному и анаэробному, различным по своей микробиологической природе и биохимизму. Сравнительная технологическая оценка жидкости, регенерированной по обоим типам, не проведена и подлежит дальнейшей проверке. В производственных условиях, при регенерации больших масс мочильной жидкости, процесс, повидимому, носит смешанный характер, т. е. имеет место комбинированная деятельность возбудителей обоих типов регенерации. Если в отношении кислоторазрушающей аэробной микрофлоры можно считать, что отработанная мочильная жидкость достаточно богато ею представлена, то далеко не так обстоит дело с анаэробной кислоторазрушающей микрофлорой. Ее большая чувствительность к кислой реакции, медленное накопление бактериальной массы, потребность в твердом дисперсном субстрате-носителе, наконец, ускорение процесса при обогащении ила метанообразующими бактериями — все эти данные указывают на возможную целесообразность искусственного обогащения водоемов для регенерации возбудителями анаэробного брожения. В особенности это приложимо к вновь пускаемым в эксплуатацию установкам, т. е. условиям, когда нет активного ила и не успел еще развиться нужный комплекс микрофлоры.

В тесной связи с последним соображением находится перспектива использования нейтрализующих соединений. Введение последних обеспечит на первых порах активное размножение анаэробов в глубинных слоях и равномерное распределение кислот в регенераторе. Что касается азотистых ускорителей, то их применение связано с выяснением механизма действия и отысканием рентабельных заменителей.

Выводы

1. Основным возбудителем анаэробной регенерации мочильной жидкости является анаэробная сарцина Eethanosarcina methanica.

2. Внесение нейтрализующих соединений в кислую мочильную жидкость вызывает более интенсивный распад сложных органических веществ, вторичное образование летучих кислот и усиленное размножение метанообразующих бактерий.

3. Искусственное обогащение ила организмами метанового брожения ускоряет процесс регенерации и может быть перспективным для вновь пускаемых в эксплуатацию установок.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной
микробиологии
Ленинград

Получено 10.VI.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычковская А. Л. Аэробная регенерация льняной мочильной жидкости в высоком слое. Микробиология, XVIII, вып. 5, 1949.
2. Мицервин В. В. О возможности регенерации мочильной жидкости анаэробным путем. Исследования по первичной обработке лубяных волокон. Сб. № 2, 1931.

3. Минервин В. В. Изыскание приемов регенерации мочильной жидкости анаэробным путем. Льнопеньковджутовая промышленность, №№ 5—6—7, 1932.
4. Миронов К. М. и Коган М. Э. Регенерация мочильной жидкости и ее использование на заводах при мочке южной конопли. Льнопеньковджутовая промышленность, № 5, 1939.
5. Barker H. A. Studies upon the Methane-Producing Bacteria. Arch. Mikrob., 7, H. 3, 420, 1936.
6. Kluyver A. I. a. van Niel C. B. Prospects for a natural system of classification. Ctbl. Bakt., Abt. 11, 94, 391, 1936.
7. Lüdtke M. Zur Kenntniss der Warmwasserröste von Flachs. Bioch. Z., 30, H. 1/2, 56, 1940.
8. Mazé P. Sur la fermentation forménique et le ferment qui la produit. C. R. de l'Acad. de Sc., 137, 888, 1903.
9. Viehl K. Untersuchungen über die anaerobe Selbstreinigung der häuslichen Abwässer. Z. Hyg. u Infekt., Bd. 123, 558, 1942.

БАКТЕРИОФАГ В СЫРОДЕЛИИ

II. УСТОЙЧИВОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ К БАКТЕРИОФАГУ ИЗ СЫРА

Е. В. Рунов, Е. П. Коноплева и *А. П. Сокольская*

В предыдущей статье [2] была показана распространенность бактериофага молочнокислых стрептококков в сыре. В настоящем сообщении освещается вопрос устойчивости молочнокислых стрептококков к бактериофагу из сыра. Этот вопрос имеет значение для выяснения роли бактериофага в созревании сыра.

Если бактериофаг в сыре обладает узкой специфичностью, то его действие будет весьма ограниченным. Влияние на созревание сыра будет носить частный характер с элементами случайности. Наоборот, поливалентность стрептококкового бактериофага будет говорить о его широком воздействии на молочнокислые стрептококки в сыре и глубоком влиянии на созревание сыра.

Методика

Яковлев [3] при определении фагоустойчивости молочнокислых стрептококков в молоке рекомендует: 1) в качестве среды применять «синее молоко» — стерильный обрат с добавлением метиленовой сини (как в редуктазной пробе); 2) одновременно с бактериофагом добавлять чувствительную культуру молочнокислых стрептококков; 3) в случае отрицательных результатов пассировать культуру до 10 раз.

Палладина, Перетц и Мазюкевич [1] остановились на методе однократного испытания культуры с внесением фага. Фагоустойчивость культуры определяется кислотонакоплением, затем производится испытание технической активности культуры. В кипяченое молоко вводится закваска из пробирки, в которой в присутствии фага произошло сквашивание. Культура считается пригодной в случае быстрого свертывания молока.

В нашей работе при определении фагоустойчивости молочнокислых стрептококков применялись стерильные (путем фильтрования через фильтр Зейтца) водные вытяжки из сыра, содержавшие фаг. Наличие фага в фильтратах устанавливалось по реакции одной и той же чувствительной культуры молочнокислых стрептококков. Средой служил стерильный обрат. Предварительно нами было испытано несколько методов определения фагоустойчивости стрептококков.

1. Метод одновременного однократного испытания с подсевом и без подсева чувствительной культуры.

2. Метод «последовательных пассажей», заключающийся в ежедневной перевивке культур (без фага и с фагом) в новые порции молока, причем в пробирку с фагом каждый раз вносился фаг из сыра.

3. Метод «последовательных пассажей» с подсевом чувствительной культуры молочнокислых стрептококков.

Критерием фагоустойчивости культур служила разность в кислотности между контрольной (без фага) и опытной культурой (с фагом) через 15 часов после выдерживания при 35°. Во внимание принималась также микроскопическая картина.

Культуры по отношению к фагу подразделялись на три группы (табл. 1).

Таблица 1

Группы молочнокислых стрептококков по устойчивости к фагу

Группа	Устойчивость культур	Изменение кислотности в культурах с фагом по сравнению с контролем (без фага)
I	Устойчивые	Без изменения или выше
II	Условно-устойчивые	Снижение до 10° Т
III	Неустойчивые	Снижение больше 10° Т

В табл. 2 приведены сравнительные данные по проверке устойчивости молочнокислых стрептококков разного происхождения по методу однократного испытания без подсева и с подсевом чувствительных культур.

Таблица 2

Устойчивость молочнокислых стрептококков к фагу при испытании двумя методами (в процентах) (86 исследованных культур)

Группы по фагоустойчивости	Методы определения фагоустойчивости	
	без подсева чувствительной культуры	с подсевом чувствительной культуры
Устойчивые	43,0	23,3
Условно-устойчивые . . .	37,2	20,9
Неустойчивые	19,8	55,8

Сопоставление этих методов указывает на преимущество второго, т. е. с подсевом чувствительной культуры. В то время как первым методом выявлено 19,8% неустойчивых культур, вторым — 55,8%.

Методы ежедневных последовательных пассажей как без подсева, так и с подсевом чувствительной культуры себя не оправдывают.

В принципе пассажи должны способствовать более полному и четкому выявлению фагоустойчивости культур; иными словами, культуры при пересадках с фагом должны постепенно терять устойчивость. Однако при обследовании большого количества культур оказалось, что культуры при длительных пассажах в ряде случаев не только не теряли устойчивости, а, наоборот, повышали ее. Это иллюстрируется табл. 3.

Результаты всех опытов с последовательными пассажами показаны в табл. 4.

При последовательных пассажах отдельных штаммов без подсева чувствительной культуры количество неустойчивых культур остается одинаковым в первом и последнем пассаже и лишь немного повышается группа условно-устойчивых.

С подсевом чувствительной культуры число неустойчивых и условно-устойчивых к V пассажу снижается. Таким образом, здесь имеет место

повышение фагоустойчивости от пассажа к пассажу. Такого рода явление можно объяснить изменением в результате адаптации к фагу соотношения между устойчивыми и неустойчивыми формами, входящими в состав культуры.

Таблица 3

Изменение устойчивости молочнокислых стрептококков при пассажах

Схема опытов \ № пассажа	Кислотность при пассажах в градусах Тернера														
	I			II			III			IV			V		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Контроль (культура без фага)	104	98	76	90	96	74	82	100	80	80	100	80	72	104	78
Культура с фагом . . .	98	92	90	78	68	84	92	78	82	94	88	82	92	90	96
Культура с фагом и подсевом чувствительной культуры	98	34	88	86	26	86	92	86	82	90	68	88	96	34	92

Примечание I, II, III, IV, V — пассажи; 1, 2, 3 — опыты.

Таблица 4

Устойчивость молочнокислых стрептококков по методу последовательных пассажей (в процентах)

Наименование культур	Количество испыт культур	Группа устойчивости	С подсевом чувствительной культуры		Без подсева чувствительной культуры		
			№ пассажа				
			I	V	I	V	X
Молочнокислые стрептококки (отдельные культуры)	25	Устойчивые	40	52	56	48	—
		Условно-устойчивые	20	16	28	36	—
		Неустойчивые . .	40	32	16	16	—
Производств. закваска для сыров типа голландского	4	Устойчивые	—	—	50	25	50
		Условно-устойчивые	—	—	25	50	25
		Неустойчивые . . .	—	—	25	25	25

Проверка устойчивости производственных заквасок методом последовательных пассажей даже при 10 пересадках не вносит ничего нового в суждение о фагоустойчивости культуры по сравнению с методом однократной проверки.

В итоге сравнительных исследований мы остановились на следующем способе определения фагоустойчивости: в 4 пробирки с 10 мл стерильного обрата вносится по одной петле испытуемой культуры; в третью и четвертую пробирки добавляется 1% свежей, чувствительной к фагу, культуры стрептококков; во вторую и третью пробирки вносится по 1 мл стерильного фильтрата из сыра. Пробирки встряхиваются и помещаются в термостат при 35° на 15 часов. Затем отмечается свертывание, производится микроскопирование из каждой пробирки и определяется

кислотность. Контролем для выявления действия фага служит первая пробирка с испытуемой культурой. По разности кислотности между третьей и первой пробирками культура по фагоустойчивости относится в одну из трех условно установленных групп (см. выше). Четвертая пробирка является контролем на отсутствие фага в испытуемой культуре, а также отсутствие антагонизма между бактериями.

Каждая серия опытов сопровождается контролем стерильности фильтрата (посев 1 мл в обрат) и действия фильтрата на чувствительную культуру.

Устойчивость молочнокислых стрептококков различного происхождения к бактериофагу из сыра

В табл. 5 демонстрируются результаты исследования действия сырного фага на различные культуры молочнокислых стрептококков.

Таблица 5

Устойчивость молочнокислых стрептококков различного происхождения к сырному фагу (в процентах)

№ пп.	Наименование культур	Происхождение культур	Количество исследов. культур	Метод определения фагоустойч. культур	Устойчивые	Условно-устойчивые	Неустойчивые
1	Отдельные культуры молочнокислых стрептококков	Из различных кисломолочных продуктов	43	I	9,3	16,3	74,4
				II	27,9	46,5	26,6
2	То же	Из рыночной сметаны	13	I	30,8	38,4	30,8
				II	61,5	30,8	7,7
3	„	Из заграничных заквасок	6	I	16,7	—	83,3
				II	16,7	—	83,3
4	„	Из сыра	9	I	55,6	44,4	—
				II	55,6	44,4	—
5	Обогащенные культуры	„ „	25	I	100,0	—	—
			70	II	100,0	—	—
6	То же	Из сметаны	6	I	66,7	33,3	
				II	83,3	16,7	

Примечание. I. по методу с подсевом чувствительной культуры; II. без подсева чувствительной культуры.

Из таблицы видно, что большое количество молочнокислых стрептококков, встречающихся в молочных продуктах, оказалось неустойчивым к сырному фагу. Из 43 коллекционных культур только 4 были устойчивыми. Из шести культур, выделенных из заграничных заквасок, устойчивостью к фагу обладала только одна. Из 13 культур из рыночной сметаны устойчивых было 4. Из 9 культур, выделенных из сыра, устойчивостью обладали 5, 4 же культуры отнесены к группе условно-устойчивых.

Следует отметить высокую устойчивость обогащенных культур, особенно из сыра. Обогащенные культуры из сыра оказались все без исключения фагоустойчивыми.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о широком воздействии бактериофага из сыра на молочнокислые стрептококки.

Связь между энергией кислотообразования и фагоустойчивостью культур

Между устойчивостью культур к фагу и их энергией кислотообразования намечается определенная зависимость: культуры с меньшей энергией кислотообразования более устойчивы к фагу, нежели сильные кислотообразователи. 86 штаммов молочнокислых стрептококков по кислотообразованию (через 24 часа при 35°) были разбиты на две группы: в одном случае в первую группу вошли штаммы с кислотностью до 90° Т, а во вторую — свыше 90° Т; в другом случае к первой группе были отнесены штаммы с кислотностью до 80° Т, а ко второй — свыше 80° Т. Результаты определения фагоустойчивости по двум методам — с подсевом и без подсева чувствительной культуры — приведены в табл. 6.

Таблица 6

Зависимость между энергией кислотообразования и фагоустойчивостью молочнокислых стрептококков (в процентах)

№ пп.	Кислотообразование в °Тернера	Количество исследованных культур	Методы определения фагоустойчивости	Устойчивых	Условно-устойчивых	Неустойчивых
1	До 90	25	С подсевом чувствительной культуры	40,0	12,0	48,0
			Без подсева	64,0	24,0	12,0
2	Свыше 90	61	С подсевом чувствительной культуры	16,4	24,6	59,0
			Без подсева	34,4	42,6	23,0
3	До 80	14	С подсевом чувствительной культуры	42,9	21,4	35,7
			Без подсева	71,4	14,3	14,3
4	Свыше 80	72	С подсевом чувствительной культуры	19,5	20,8	59,7
			Без подсева	37,5	43,1	19,4

Распределение бактерий по группам фагоустойчивости отчетливо указывает, что наибольшее число неустойчивых форм встречается среди активных кислотообразователей. Если встать на точку зрения, что Str. lactis представляют собой «окультуренные» формы диких молочнокислых стрептококков, то можно предполагать, что приспособление к жизни в молочной среде ведет к утрате способности противостоять фагу.

Таблица 7

Влияние длительности культивирования на фагоустойчивость молочнокислых стрептококков (в процентах)

Наименование культур	Количество исслед. культур	Время исследований	Устойчивые	Условно устойчивые	Неустойчивые
Отдельные культуры молочнокислых стрептококков	21	Сентябрь 1946 г.	76,2	9,5	14,3
		Апрель 1947 г.	52,4	33,3	14,3
Обогащенные культуры из сыра	11	Сентябрь 1946 г.	100	—	—
		Сентябрь 1947 г.	100	—	—

Примечание. Фагоустойчивость определялась без подсева чувствительной культуры.

Дополнительное подтверждение этого факта можно видеть из табл. 7, в которой приведены данные по фагоустойчивости молочнокислых стрептококков в зависимости от сроков культивирования их в лабораторных условиях.

Отдельные культуры молочнокислых стрептококков в лабораторных условиях довольно быстро теряют фагоустойчивость. Обогащенные же культуры обнаруживают значительную стойкость. Но и они со временем становятся чувствительными. Так, обогащенная культура из ярославского сыра с пятилетним лабораторным стажем оказалась неустойчивой к бактериофагу. Между тем при получении эта культура в качестве закваски испытывалась в производственных условиях и характеризовалась устойчивостью при многочисленных пересадках.

Значение бактериофага из сыра при подборе культур для заквасок

С практической стороны представляет интерес использование бактериофага из сыра для отбора фагоустойчивых культур для производства заквасок. Мы проследили поведение в заводских условиях нескольких партий комбинированных сухих заквасок для голландского сыра, в состав микрофлоры которых входили, помимо молочнокислых палочек, фагоустойчивые стрептококки. Фагоустойчивость стрептококков определялась отношением их к сырному фагу. Ниже приводятся характерные данные испытания одной из партий заквасок, включавшей палочки и 6 культур стрептококков. Эта закваска выдержала множество пересадок (90) без потери активности и при сохранении группового состава стрептококков и палочек, при количественном преобладании стрептококков (табл. 8).

Таблица 8

Качество комбинированной закваски

Общее количество пересадок	Количество пересадок при разных температурах сквашивания	Температуры культивирования	% закваски при пересадках	Продолжительность сквашивания	Кислотность перед пересадкой в °Т	Сгусток	Консистенция	Вкус и аромат	Микроскопич. картина	Газообразующие бактерии по среде Кесслера
90	22	26—28°	5	7 ч. 20 м.	94	Плотный	Сметанообразная	Чистый выраженный	Диплококки, короткие цепочки диплококков, палочки	Отсутствие
	68	23—24°	5	7 ч. 45 м.	89	„	„	„	Диплококки, короткие цепочки диплококков, палочки	

Примечание. Приводятся средние данные характеристики закваски.

В подтверждение устойчивости указанной выше закваски к стрептококковому бактериофагу был поставлен специальный лабораторный опыт с заражением закваски стерильным фильтратом из сыра, содержащим фаг. Титр фага в фильтрате равнялся 10^{-6}.

№ варианта	Варианты опыта
1	Закваска (контроль)
2	„ + 1% фильтрата в начале опыта
3	„ + 1% чувствительной к фагу культуры
4	„ + 1% чувствительной к фагу культуры + 1% фильтрата в начале опыта
5	„ + 1% чувствительной к фагу культуры + 1% фильтрата ежедневно

Во 2-м и 4-м вариантах фильтрат вносился только при постановке опыта, в 5-м варианте фильтрат добавлялся ежедневно. Чувствительная культура вводилась 1 раз в начале опыта (варианты 3, 4, 5-й). Ежедневно закваска подвергалась пересадкам. Всего было 10 последовательных пересадок. Опыт ставился на пастеризованном молоке в стерильных стаканах. Температура пастеризации 95°. Продолжительность пастеризации 50 минут. Количество молока 200 мл. Закваски (43-й производственной пересадки) вносилось 5%. Температура культивирования 29—30°. Закваска вынималась из термостата по мере свертывания и выдерживалась на холоду (при температуре ниже 10°) до следующего дня (около 20 час.), после чего производились органолептическая оценка, микроскопирование и определение кислотности.

Результаты опыта приведены в табл. 9, где дается характеристика заквасок 1, 5 и 10-й пересадок.

Таблица 9

Устойчивость производственной закваски к бактериофагу

№ варианта / Показатели	Закваска (контроль)			Закваска + 1% фильтрата			Закваска + 1% чувствительной культуры (молочнокислых стрептококков)			Закваска + 1% фильтрата + + 1% чувствительной культуры молочнокислых стрептококков			Закваска + 1% чувствительной культуры молочнокислых стрептококков + 1% фильтрата ежедневно		
	пересадки														
	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10
Продолжительность свертывания	6ч.	6ч.	6 ч. 30м.	6 ч. 10м.	6 ч.	5 ч. 30м.	6 ч.	5 ч. 30м.	5 ч. 30м.	6 ч.	5 ч. 45м.	5 ч. 30м.	6 ч.	5 ч. 30м.	5 ч. 30 м.
Кислотность перед пересадкой	98	102	94	96	100	90	90	100	90	90	100	90	90	100	92
Микроскопический препарат	Диплококки, короткие цепочки диплококков. Палочки														
Вкус и аромат	Чистый, приятный молочнокислый														
Сгусток	Плотный														

По всем показателям в течение 10 пересадок какой-либо существенной разницы между контролем и отдельными вариантами не наблюдалось. Это говорит о фагоустойчивости закваски.

Для проверки наличия бактериофага в заквасках по окончании опыта, т. е. через 10 пересадок, из закваски всех вариантов был получен

стерильный фильтрат и проверен на наличие в нем бактериофага. Одновременно была испытана на присутствие бактериофага свежая производственная закваска 53-й пересадки, культивировавшаяся в производственных условиях.

Присутствие бактериофага устанавливалось по действию фильтратов на чувствительную культуру. В 10 мл стерильного обрата вносился 1 мл фильтрата. Контролем служили пробирки без фильтрата. Заражение молока производилось 1 петлей. Через 20 час. после выдерживания в термостате при 30° определялась кислотность и производилось микроскопирование. В фильтратах был также определен титр бактериофага по методу разведений на гидролизованном панкреатином молочном бульоне (табл. 10).

Таблица 10

Наличие бактериофага в закваскаx опытных вариантов и из производства

Культура	Фильтрат + происхождение фильтрата	Микроскопический препарат	Кислотность через 20 час. при 30° Т	Титр фага в фильтратах
Чувствительная культура молочнокислых стрептококков	—	Очень много диплококков	94	—
То же	+ вариант 1	От 1 до 5 диплококков в поле зрения	32	1
„	+ вариант 2	Единичные диплококки	30	1
„	+ вариант 3	Единичные крупные диплококки в отдельных полях зрения	34	1
„	+ вариант 4	Единичные крупные диплококки	26	1
„	+ вариант 5	От 5 до 10 крупных диплококков в поле зрения	28	10^{-6}
„	+ производственная закваска	Единичные диплококки в отдельных полях зрения	28	1

Как видно из таблицы, бактериофаг присутствовал во всех закваскаx как без добавления фага, так и с внесением фага и чувствительной к фагу культуры молочнокислых стрептококков.

Концентрация бактериофага в закваскаx небольшая, за исключением закваски, в которую ежедневно вносился фильтрат из сыра. Титр фага в закваскаx, в которые бактериофаг был внесен только в начале опыта, не повысился.

Исходные культуры стрептококков, входившие в состав микрофлоры заквасок, были подвергнуты действию фильтратов, полученных из заквасок опытных вариантов. Проверка показала, что ни одна культура не реагировала на внесение фильтратов. Все они были устойчивыми. Таким образом, устойчивость закваски при пересадках определяется не отсутствием фага, а резистентностью бактерий.

В заключение мы приводим наблюдения за комбинированной закваской, культивировавшейся в заводских условиях с начала января по конец апреля 1948 г. Комбинированная закваска включала молочнокислые палочки и 7 культур фагоустойчивых стрептококков. Фагоустойчивость стрептококков определялась отношением к фагу из сыра. Закваска, несмотря на неблагоприятное время года, когда возможность появления фага в закваскаx особенно велика, выдержала 74 пересадки с сохранением высокой активности, хороших органолептических свойств

и группового микробного состава — стрептококков и палочек, при господствующем положении стрептококков в культурах (табл. 11).

Таблица 11

Качество комбинированной закваски

Общее количество пересадок	Температура культивирования	% закваски при пересадке	Продолжительность сквашивания	Кислотность перед пересадкой в °Т	Сгусток	Консистенция	Вкус и аромат	Микроскопич. картина	Газообразующие бактерии по среде Кесслера
74	32—28	5	7 ч. 20 м. —6 ч.	80—96	Плотный	Сметанообразная	Чистый, выраженный	Диплококки, короткие цепочки диплококков, палочки	Отсутствие

Из закваски 74-й пересадки был получен стерильный фильтрат и проверен на содержание в нем фага по действию на чувствительную культуру стрептококков в молоке, на гидролизованном молочном бульоне и на твердой питательной среде. В закваске было установлено отсутствие фага как по отношению к чувствительной культуре, так и к культурам стрептококков, входившим в микробный состав закваски.

Из вышеописанных данных следует, что использование бактериофага из сыра для определения фагоустойчивости молочнокислых стрептококков позволяет отбирать для производственных целей устойчивые к фагу культуры молочнокислых стрептококков.

Выводы

1. Бактериофаг из сыра характеризуется поливалентностью по отношению к молочнокислым стрептококкам. Обогащенные культуры из сыра обладают фагоустойчивостью к бактериофагу из сыра.

2. Между фагоустойчивостью и энергией кислотообразования молочнокислых стрептококков наблюдается обратная зависимость.

3. Длительное культивирование молочнокислых стрептококков в лабораторных условиях ведет к снижению фагоустойчивости.

4. Использование бактериофага из сыра представляет практическую ценность для подбора фагоустойчивых культур молочнокислых стрептококков.

Всесоюзный научно-исследовательский институт сыродельной промышленности
Углич

Получено 17. VI. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Палладина О. К., Перетц Л. Г. и Мазюкевич В. А. О борьбе с бактериофагом молочнокислого стрептококка. Микробиология, XII, вып. 1, 1943.
2. Рунов Е. В. Распространенность стрептококкового бактериофага в сыре. Микробиология, XVII, вып. 2, 1949.
3. Яковлев Д. А. Бактериофаг молочнокислых стрептококков. Микробиология, VIII, вып. 8, 1939.

О ПОЛУЧЕНИИ ВЫКОРМОК ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА, СВОБОДНЫХ ОТ ЖЕЛТУХИ

Л. М. Тарасевич

Разработка мер борьбы с вирусным заболеванием тутового шелкопряда — желтухой — до сих пор не давала эффективных результатов, главным образом по методическим причинам.

Эти причины в основном сводятся к тому, что исследователи, ведущие опыты по желтухе, большей частью не имеют здоровых контролей наряду с искусственно зараженными гусеницами. Часто наблюдаемое заболевание желтухой контрольных серий опытов сильно снижает ценность проведенного эксперимента и полученные из него выводы.

Получение здоровых выкормок шелкопряда имеет большое значение для практики, так как в производственных выкормках также иногда внезапно возникает желтуха.

К разрешению этой задачи мы, по предложению Рыжкова, подошли путем применения целого комплекса мероприятий. Ориентировочные опыты были поставлены в 1946 г. и повторены в 1947 и 1948 гг. [3]. Прежде всего проводился ряд профилактических мероприятий: места содержания гусениц и инструменты тщательно промывались щелочью. Перед кормлением гусениц, при переходе от одного варианта к другому и после кормления ухаживающий персонал тщательно мыл руки с мылом. Кормление контролей производилось в предварительно прокипяченных резиновых перчатках. Этими мерами мы предупреждали занесение инфекции извне.

Для уничтожения вируса с поверхности грены применялось протравливание ее (1 мин.— 2% NaOH, 1 час — промывание проточной водой и 15 мин.— 96° спиртом).

И, наконец, во избежание заражения уже заболевших гусениц друг от друга, что является основным источником массового распространения инфекции, проводилась индивидуальная культура гусениц.

Ниже мы рассмотрим подробно ход опытов и результат применения указанных мероприятий.

Опыт был проведен в 1946 г. Часть грены протравливалась указанным выше методом, а часть оставалась непротравленной. Каждый из этих вариантов делился на две части:

1) 25 гусениц содержались по одной гусенице (индивидуальная культура) в плотных бумажных коробочках;

2) 50 гусениц содержались вместе (массовая культура) — в большой коробочке. Результат опыта приводится в табл. 1.

Из таблицы видно, что протравливание грены резко снижает заболеваемость гусениц желтухой при индивидуальной культуре. Желтуха констатировалась микроанализом каждой погибшей гусеницы.

При массовой культуре протравливание не дало снижения заболевания. Очевидно, это объясняется главным образом возможностью вторичного заражения гусениц. Гибель гусениц от других причин (бактериозов, грибковых заболеваний) в индивидуальной культуре также резко снижается.

Таблица 1

Культура гусениц	Число гусениц в каждом опыте	Число гусениц, погибших от желтухи		Число гусениц, погибших от других причин	
		в непротравленном варианте	в протравленном варианте	в непротравленном варианте	в протравленном варианте
Индивидуальная . .	25	9	1	4	4
Массовая	50	10	11	24	12

Весной 1947 г. был проведен новый опыт получения безжелтушной выкормки. Гусеницы выводились из грены, полученной в опыте 1946 г.

Опыт проводился в тех же условиях, лишь с тем изменением, что коробки имели крышки с отверстиями для воздуха, так как выкормка 1946 г. показала необходимость исключения из опыта возможности переползания гусениц из одной коробки в другую, переноса инфекции мухами и подсыхания скармливаемых листочков. Результаты опыта 1947 г. приведены в табл. 2.

Таблица 2

Культура гусениц	Число гусениц в каждом опыте	Число гусениц, погибших от желтухи		Число гусениц, погибших от других причин	
		в непротравленном варианте	в протравленном варианте	в непротравленном варианте	в протравленном варианте
Индивидуальная . .	50	0	0	0	3
Массовая	50	0	0	11	8

Из таблицы видно, что ни одна гусеница не погибла от желтухи, в то время как искусственно зараженные гусеницы этого же выхода (100 гусениц) почти все погибли от желтухи.

Все гусеницы, за исключением погибших от других причин, завили коконы, причем выкармливаемые в индивидуальной культуре — на $1^1/_2$ недели раньше гусениц массовой культуры.

Из приведенных опытов 1946 и 1947 гг. видно, что применяемый нами комплекс мероприятий (строгая профилактика, асептика, протравливание грены в сочетании с индивидуальной культурой гусениц) значительно снизил процент гибели гусениц от желтухи, а затем совсем освободил выкормку от нее.

Если в опыте 1946 г. некоторый процент гусениц еще погибал от желтухи (табл. 1), то в опыте 1947 г., где последовательно применялись те же мероприятия, уже не было ни одной заболевшей желтухой гусеницы.

В 1948 г. мы еще раз поставили подобные опыты, но с точным учетом тех показателей, которые особенно интересны производству.

Был подробно прослежен и учтен процесс выхода мурашей из протравленной и непротравленной грены. Грена была вынута из ледника 8.V. 500 яиц протравливались, а 500 только смачивались водой. Выход мурашей начался 24.V (табл. 3).

Таблица 3

Число яиц	Снятие грены с ледника	Обработка грены	Выход мурашей					Вывелось в %
			24.V	25.V	26.V	27.V	28.V	
500	8.V	Протравлена	6	186	207	39	4	88,4
500	8.V	Не протравлена	3	164	181	90	8	89,2

Из таблицы видно, что протравливание грены не снижает процента выхода мурашей (разница 0,8% является ничтожной).

Изучалось действие протравливания на развитие гусениц в индивидуальной и массовой культуре.

Из протравленной и непротравленной грены по 50 мурашей содержалось в индивидуальной и массовой культурах. От яйца и до завивки коконов ни одна гусеница не погибла от желтухи, в то время как контрольные гусеницы, которые искусственно заражались вирусом, погибали от желтухи на 7—8-й день в большом количестве (14 из 20 гусениц).

Гибель гусениц наблюдалась главным образом от бактериальных заболеваний, но в индивидуальной культуре гусеницы болели в разные сроки по одной, редко по две, в то время как в массовой культуре гусеницы заболевали сразу в большом количестве. Так, в протравленном массовом варианте 22.VI заболело 13 гусениц, 24.VI в непротравленном массовом варианте — 8 гусениц и т. д.

Завивка коконов началась (24.VI) на 2 дня раньше в протравленных вариантах и окончилась (29.VI) на 7 дней раньше, чем в непротравленных вариантах, где завивка проходила с 26.VI по 6.VII.

Гусеницы из протравленной грены отличались более крупными размерами по сравнению с гусеницами из непротравленной грены.

Перед завивкой коконы гусеницы всех вариантов были взвешены по одной и полученные данные обработаны статистически. В табл. 4 приводится средний вес гусениц каждого варианта.

Таблица 4

Обработка грены	Культура гусениц	Число гусениц в опыте	Число гусениц, погибших от желтухи	Средний вес 1 гусеницы перед завивкой в г	Средняя ошибка	Срок завивки коконов	Число гусениц, завивших коконы	Средний вес кокона в г	Средняя ошибка	Начало выхода бабочек
Протравливание	Индивидуальная	50	0	4,81	$m=\pm0,12$	24.VI — 29.VI	36	2,42	$m=\pm0,06$	13,VII
	Массовая	50	0	4,36	—		14	2,13	$m=\pm0,12$	13,VII
Нет протравливания	Индивидуальная	50	0	4,09	$m=\pm0,11$	26.VI — 6.VII	39	2,07	$m=\pm0,06$	17,VII
	Массовая	50	0	3,26	—		18	1,88	$m=\pm0,09$	18,VII

Необходимо отметить, что проводимые нами выкормки находились не в оптимальных условиях питания, так как работа велась в Москве и вынужденная экономия тутовых листьев снижала уровень урожая коконов. Мы не сомневаемся, что в условиях полного достатка корма общий уровень урожая коконов был бы намного выше.

Из таблицы видно, что гусеницы из протравленной грены весят больше, причем гусеницы индивидуальной культуры превосходят по весу остальных.

Разница в весе является статистически достоверной ($t = 4{,}5$). Число гусениц, завивших коконы, в индивидуальной культуре было немного больше, чем в массовой культуре (табл. 4).

Коконы также взвешивались по одному, и полученные данные обрабатывались статистически.

Средний вес кокона оказался максимальным в индивидуальной культуре с предварительным протравливанием грены и минимальным в массовой культуре, где грена не протравливалась. Результат является достоверным при сравнении рядов m_1 и m_3 ($t = 4{,}1$) и тем более m_1 и m_4 ($t = 5{,}4$). При сравнении других рядов результат является статистически недостоверным.

Выход бабочек начался также раньше всего в индивидуальной культуре протравленного варианта (13.VII), при этом 20.VII и 21.VII вышли почти все бабочки. В протравленном варианте массовой культуры выход бабочек также начался 13.VII, но проходил в более растянутые сроки.

Выход бабочек из коконов непротравленных вариантов начался 17.VII, т. е. на 4 дня позже. Таким образом, кроме непосредственного действия на вирус, протравливание не только не является вредным, но даже действует стимулирующим образом на прохождение гусеницами стадий развития.

Согласно работам Похил и Тараненко, [2], Дикасовой [1] и других, вирус передается через грену, находясь и внутри нее. В наших опытах мы избежали этой передачи, видимо, потому, что в течение нескольких лет у нас шел отбор здоровой грены.

Браковка больной грены еще лучшим образом дополнила бы весь комплекс мер борьбы с желтухой.

Индивидуальная культура гусениц для борьбы с желтухой в условиях лаборатории имеет огромное преимущество перед массовой. Прежде всего в индивидуальной культуре совершенно исключается возможность вторичного заражения, так как при появлении инфекции можно изъять заболевшую гусеницу (сжечь вместе с коробкой), прекратив распространение инфекции, что невозможно при массовой культуре.

Кроме того, при индивидуальной культуре сильно облегчается наблюдение и учет гусениц. Так как строгая асептика и протравливание грены в сочетании с индивидуальной культурой гусениц дали в наших опытах хорошие результаты по борьбе с желтухой, было бы желательно испытание нашей методики работы и другими исследователями.

Выводы

1. Протравливание грены не снижает процента выхода мурашей. Протравливание производилось следующим образом: 1 мин.— 2% NaOH, 1 час — промывание проточной водой и 15 мин.— 96° спиртом.

2. Протравливание грены стимулирует развитие гусениц. Гусеницы из протравленной грены крупнее, раньше и дружнее завивают коконы, дают больший урожай коконов, более ранний выход бабочек.

3. Протравливание грены резко снижает заболеваемость гусениц желтухой, но не снижает процента заболеваемости от других причин.

4. Индивидуальная культура в сочетании с протравливанием грены резко снижает заболеваемость гусениц желтухой.

5. Индивидуальная культура снижает процент заболеваемости от других причин.

6. Индивидуальная культура гусениц усиливает положительный результат протравливания грены, давая в сочетании с ним наилучшие показатели в условиях лаборатории.

Московский медицинский институт
Министерства здравоохранения
РСФСР

Получено 10.X.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Дикасова Е. Т. Исследование грены тутового шелкопряда, полученной от зараженных желтухой бабочек. Микробиология, т. XVIII, вып. 4, 1949.
2. Похил А. И. и Тараненко Н. Н. К вопросу о передаче инфекции желтухи у тутового шелкопряда через инфицированное яйцо. Анналы Мечниковского института, т. IV, вып. 2, 1935.
3. Тарасевич Л. М. К вопросу о происхождении вирусов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, т. XXVI, № 8, вып. 2, 1948.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В. С. БУТКЕВИЧА ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРЕВРАЩЕНИЙ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМАХ И ХИМИЗМУ ОБРАЗОВАНИЯ В НИХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

М. В. Федоров

Разносторонние исследования Буткевича по превращениям белковых веществ в растительных организмах и химизму образования в них органических кислот имеют важное теоретическое значение, но они мало учитываются как в учебной, так и в специальной литературе. Нередко встречаются даже случаи, когда эти работы или совсем замалчиваются, или же трактуются односторонне и неправильно. В связи с этим возникает необходимость вновь подвергнуть рассмотрению важнейшие научные выводы, вытекающие из этих исследований.

Особый интерес в этом отношении представляют работы Буткевича по превращениям белковых веществ в растительных организмах. Они были выполнены им в конце прошлого и в начале настоящего столетия. В тот период у физиологов растений еще не было ясных представлений о том, каковы последовательные этапы разложения белковых веществ в растениях и какие первичные продукты возникают при этом разложении. Одни из них полагали, что химизм распада белка определяется только строением белковой молекулы и поэтому будет давать одинаковые продукты разложения, независимо от того, что лежит в основе этого разложения — воздействие химических реагентов или же составных частей протоплазмы. Другие же исследователи допускали, что в зависимости от воздействующих на белок реагентов могут получаться различные конечные продукты его разложения. При такой трактовке вопроса неизбежным становилось допущение, что распад белковых веществ в организме растения происходит особым путем и дает конечные продукты, зависящие от свойств живой протоплазмы. Особенно острые разногласия получались по вопросу образования аспарагина, всегда обнаруживавшегося в значительных количествах при распаде белка в растениях. Одни исследователи полагали, что аспарагин возникает главным образом в результате вторичных процессов превращения продуктов распада белка; другие считали его главным первичным продуктом, образующимся из белка непосредственно и в больших количествах наряду с углеводами. Эти разногласия носили принципиальный характер, и в зависимости от направления, в котором они разрешались, нужно было строить и схему первичного разложения белкового вещества.

Первая точка зрения отстаивалась Бородиным, Прянишниковым, Шульце и другими. «Я полагаю вместе с Шульце,— писал в своей статье «о физиологической роли аспарагина» Бородин (1882),— что в растении этот распад обусловливается пока еще неизвестным ферментом, который находится в растениях и является деятельным не только во время прорастания, но и в течение всего жизненного периода».

Вторая точка зрения отстаивалась Палладиным, Детмером, Пфеффером и другими. Они полагали, что при распаде белковых веществ в растениях образуются только аспарагин и углеводы.

Из сопоставления этих высказываний можно видеть, что в тот период представление о гидролитическом распаде белковых веществ в

растениях было еще недостаточно ясным. Особенно резким противником вторичного образования аспарагина выступил Пфеффер (1897, стр. 301). В первом издании своего курса физиологии растений он писал: «Совершенно необоснованное предположение делает Шульце, принимая, что распад белковых веществ в растении дает амиды в том же соотношении, как и расщепление химическими агентами. В действительности мы не можем ожидать такого соответствия, ибо уже многочисленные опытные данные химии показывают, что при различных операциях продукты распада одного и того же тела являются неодинаковыми... С этим предположением отпадает и признаваемое Шульце необходимым объяснение для накопления аспарагина, по которому это тело при расщеплении белка образуется только в сравнительно незначительном количестве, но при продолжающемся распаде белковых веществ накопляется, так как аспарагин труднее перерабатывается, чем другие амиды».

Таким образом, выходит, что для признания первой точки зрения, по которой распад белка мыслился как гидролитический процесс расщепления, нехватало данных о наличии в растениях протеолитического фермента, способного расщеплять белковую молекулу до аминокислот, и данных о возможности образования аспарагина вторичным путем. Вот эту недостающую и наиболее важную часть доказательств вторичного образования аспарагина и получил в своих работах Буткевич. Он изучил химическую природу ряда азотистых веществ, образующихся при распаде белка в прорастающих семенах люпина, а затем получил из них экстракты протеолитических ферментов и с их помощью доказал, что переваривание ими белка приводит к образованию ряда аминокислот, но не аспарагина. «Присоединение к лейцину и тирозину аргинина, этого характерного для гидролитического расщепления белковой молекулы продукта,— пишет по этому поводу Буткевич,— убеждает нас еще более в том, что в сопровождающем самопереваривание превращении мы имеем процесс обычного гидролиза.

Таким образом, действие фермента, проявляющееся в опытах самопереваривания, сопровождается образованием типичных для гидролитического расщепления белковой молекулы продуктов, каковыми являются открытые уже лейцин, тирозин и аргинин» (1904, стр. 59).

Этими данными определенно устанавливалось, что в растительных клетках содержатся протеолитические ферменты, и, кроме того, определенно доказывалось, что их гидролитическое воздействие на белок приводит к образованию типичных для гидролиза аминокислот, а не аспарагина и углеводов. Эти факты, точно установленные экспериментально, имели важнейшее значение для понимания механизма расщепления белковой молекулы в растительном организме. Они впервые и с определенностью показывали, что протеолитические ферменты являются важнейшими агентами расщепления белковой молекулы, что от их воздействия зависит степень разложения белка, а от химической природы белковой молекулы — характер продуктов, возникающих при этом воздействии. Важнейший процесс жизнедеятельности живого растительного организма получил, наконец, определенную ясность и был тщательно обоснован экспериментально.

Большое внимание при этих исследованиях было уделено Буткевичем выяснению путей образования и главного спорного продукта — аспарагина. Как уже указывалось ранее, многие исследователи считали тогда, что аспарагин образуется первично и является основным продуктом распада белка. Однако при своих весьма тщательных исследованиях продуктов этого распада Буткевичу не удалось обнаружить заметного образования аспарагина при воздействии на белок протеолитических ферментов. Не удалось ему обнаружить аспарагина и при распаде белковых веществ в затененных растениях. Сопоставляя для различных

периодов пребывания растений в темноте убыль азота белковых веществ с нарастанием в них азота аспарагина, он пришел к выводу, что и в затененных растениях аспарагин образуется за счет других продуктов распада белковых веществ, а не непосредственно из белка. После всех этих опытов стало очевидным, что аспарагин является не первичным, а вторичным продуктом распада белковых веществ. Эту мысль Буткевич формулировал следующими словами.

«Что касается в изобилии образующегося в прорастающих семенах бобовых и особенно лупинов аспарагина, то образование его в сколько-нибудь заметном количестве при расщеплении белковых веществ ферментом этих семян в моих опытах, вопреки показаниям Грина, не было обнаружено. Этот результат, при допущении, что и в растении первичный распад белков совершается под влиянием протеолитического фермента,— при допущении, к рассмотрению которого я еще вернусь,— приводит к заключению, что в них аспарагин, по крайней мере в главной своей массе, образуется не непосредственно из белковых веществ, а при дальнейшем превращении продуктов их распада» (1904, стр. 59).

При детальном исследовании продуктов, возникающих из белка под влиянием протеолитического фермента, Буткевичу удалось установить, что в их составе имеются вещества, легко отщепляющие аммиак при обработке слабой соляной кислотой. При этом оказалось, что к таким веществам не относится аспарагин. В связи с этим возникла мысль: не образуется ли амидная группа аспарагина за счет аммиака? Эту важнейшую мысль, определившую по существу понимание физиологической роли аспарагина в растениях, Буткевич формулировал следующими словами: «Если азот последнего (т. е. аммиака), как показывают приведенные выше данные, не принадлежит аспарагину, то может являться вопрос, не представляет ли он, по крайней мере, того источника, из которого последний, образуясь в растении, заимствует свой амидный азот» (1904, стр. 60). Эта мысль была весьма важной, и когда при исследовании азотистого обмена этиолированных ростков растений ему удалось установить, что и здесь аспарагин образуется за счет других продуктов распада белковых веществ, она получила дополнительное и важное подтверждение. Вторичное образование аспарагина, таким образом, было доказано, а история его происхождения и физиологическая роль в растении стали вполне ясными. В результате этих исследований спорный вопрос о физиологическом ходе превращения белковых веществ в растениях, занимавший умы многих выдающихся физиологов того времени, получил, наконец, вполне определенное и экспериментально безупречное решение. Это решение формулировано Буткевичем следующими словами: «Мы можем признать за аспарагином лишь значение соединения, в форме которого в растении временно отлагается аммиак, не успевающий по тем или другим причинам потребиться на образование белковых и других азотистых соединений,— будет ли то аммиак, поступающий в растение извне, или образующийся из поступающей в него извне азотной кислоты, или же аммиак, образующийся в самом растении, как конечный продукт регрессивного метаморфоза азотистых веществ — аммиак, непосредственное накопление которого в организме, как такового, является невозможным вследствие его вредного влияния... Это определение роли аспарагина не исключает, конечно, его значения для передвижения в растении азота — значения, которое он разделяет с другими первичными продуктами гидролитического расщепления белковых веществ» (1904, стр. 121—122). Не нужно быть искушенным физиологом, чтобы понимать, сколь существенное значение имели установленные Буткевичем факты для определения физиологической роли аспарагина. В них уже заключалась вся основа будущей классической формулы Прянишникова, что «аммиак есть альфа и омега превращения азотистых веществ в растениях».

В более поздних работах Буткевичу удалось установить образование аммиака в качестве промежуточного продукта и при разложении белковых веществ грибами. При этом он не просто констатировал факт образования этого вещества, но и дал ему совершенно точное объяснение, послужившее основой для понимания процессов аммонификации, осуществляющихся под влиянием различных микроорганизмов. Вот его объяснение: «Удовлетворением потребности организма в материале для дыхания и отчасти в строительном материале за счет освобождающихся при дезаминировании углеродистых комплексов и объясняется та тесная связь, которая обнаруживается между развитием гриба, с одной стороны, и процессом аммонизации азота предоставленного ему белкового вещества — с другой. Дезаминирование первичных продуктов распада белковой молекулы является подготовительной ступенью, делающей доступным для гриба находящийся в этих продуктах углеродистый запас,— ступенью, переводящей его из инертного состояния в физиологически активное. Понижающее влияние сахаров на накопление аммиака обусловлено усилением развития мицелия и связанным с ним повышением потребления образующегося при дезаминировании аммиака» (1916, стр. 38—39).

Эти положения, характеризующие превращение белковых веществ в культурах плесневых грибов, также имеют важнейшее теоретическое значение для понимания хода аммонификации в культурах различных микроорганизмов. Они впервые и с очевидностью установили, при каких условиях может образоваться и накапливаться аммиак. На основе этих данных впервые появилась возможность точно установить как характер влияния углеводов на накопление аммиака в грибных культурах, так и значение отношения углерода к азоту в разлагающемся материале для накопления аммиака. Современные исследования над разложением азотистых органических веществ самого различного состава и самыми различными микроорганизмами показали, что отношение углерода к азоту действительно имеет важнейшее значение и определяет ход накопления аммиака. В большинстве случаев быстрое появление этого вещества в среде имеет место только при распаде органических азотистых веществ, содержащих в своем составе углерод и азот в отношении менее чем 20 : 1.

Зная этот показатель, мы теперь можем легко ориентироваться не только в возможности появления аммиака в культуре, но и в сроках появления подвижного азота в почве при внесении в нее различных органических удобрений. Последнее обстоятельство важно не только для установления правильности предложенной теории, но и для решения чисто практических вопросов применения органических удобрений в сельскохозяйственном производстве. Поэтому переоценить теоретическое и практическое значение установленных Буткевичем закономерностей довольно трудно, и это еще раз показывает нам, какое важное значение имели его исследования для дальнейшего развития науки в той области, которой они касались непосредственно.

Правильность этого положения легко подтвердить рядом примеров, но типичным для данной серии работ является пример оценки им физиологической роли протеолитических ферментов и их связи с протоплазмой клетки.

В своей монографии «Регрессивный метаморфоз белковых веществ» в заключительной части Буткевич указывает, что «самое отношение между ферментами и протоплазмой в живой клетке остается пока невыясненным. Весьма вероятно, что группы, проявляющие определенное ферментативное действие, в живой клетке входят в состав соединений, из которых построены протоплазматические образования» (1904, стр. 140). Как известно, новейшие исследования по химическому строению ферментов весьма убедительно показали, что, во-первых, гидролитические ферменты образуются из белков протоплазмы и, во-вторых,

активные группировки окислительно-восстановительных ферментов хотя и могут образовыватья за счет ядерных веществ клетки, однако для проявления своих каталитических свойств они нуждаются в участии специфических белков протоплазмы. Из этого сопоставления можно видеть, что предположение Буткевича о связи ферментов с протоплазмой, высказанное им еще в 1904 г., к нашим дням получило полное подтверждение. Более глубокое проникновение в физиологию растительной клетки и более справедливую оценку возможных результатов научного развития затронутой научной проблемы трудно себе представить.

Такое же значение имели исследования Буткевича и по установлению физиологической роли аспарагина в растениях. Кто теперь сомневается в том, что это вещество выполняет важнейшую функцию в превращении азотистых веществ в растениях? При избыточном снабжении растений аммиаком аспарагин образуется в больших количествах за счет взаимодействия углеродистых радикалов, возникающих при окислении углеводов и аммиака, и обезвреживает ядовитые свойства последнего. При интенсивном разложении белковых веществ в растениях, также сопровождающемся усиленным образованием аммиака, это вещество вновь образуется в растении в больших количествах и обезвреживает те же ядовитые свойства аммиака. Эти положения стали теперь общепризнанными и вошли во все учебники физиологии растений.

«Аспарагин (и глютамин, вполне ему аналогичный), таким образом, является уже не только первичным продуктом распада,— пишет в своем «Кратком курсе физиологии растений» Н. А. Максимов,— но и результатом синтеза сложных азотсодержащих веществ из аммиака и углеродных цепей. Взгляд этот получил окончательное подтверждение в классических опытах Д. Н. Прянишникова, которому удалось наблюдать в семенах синтез аспарагина не только за счет уже имеющихся в прорастающем семени аминокислот, но и за счет даваемого семенам извне аммиака, именно при проращивании их в растворах аммонийных солей» (1948, стр. 275).

Образование аспарагина связано с превращениями не только аммиака, но и органических кислот и углеводов. Поэтому в дальнейшем Буткевич главное внимание в своих исследованиях отвел органическим кислотам, химизму их образования из углеводов и характеристике их физиологической роли в растениях. Вначале им были изучены превращения углеводов в культурах плесневых грибов, приводящие к образованию лимонной, щавелевой, фумаровой, глюконовой, янтарной, яблочной, винной и других кислот, а затем определена и их физиологическая роль в растительных организмах. Значение этих работ Буткевича также весьма существенно, так как ими определяется не только детальная характеристика условий, определяющих их образование, но и направление процессов, приводящих к накоплению этих продуктов в культурах микроорганизмов. Помимо этого они по-новому осветили и общие физиологические проблемы в области окислительного превращения углеводов. На основе этих работ была опровергнута старая схема превращения безазотистых органических веществ в процессах дыхания, базировавшаяся на обязательном образовании в промежуточных стадиях, способных к брожению сахаров. Эту схему, как известно, настоятельно защищали Костычев и другие выдающиеся представители физиологии растений.

«Лишь недавно,— писал Костычев в курсе физиологии растений (1933, стр. 220) — экспериментально доказана общая закономерность питания грибов: удалось выяснить, что для бесхлорофильных грибов, так же как и для зеленых растений, исходными веществами являются углеводы и белки. Такие безазотистые органические вещества, как маннит, глицерин, винная кислота, молочная кислота и хинная кислота, превращаются грибом в глюкозу». Однако Буткевич собрал экспери-

ментальные материалы, бесспорно доказавшие, что эта точка зрения не отвечает действительности. Его ответ Костычеву был сформулирован следующим образом: «Полученные нами данные не дают никакого повода для допущения, что промежуточной ступенью при потреблении грибами хинной кислоты являются углеводы, как это принимает С. П. Костычев. При нормальных условиях культуры, а также при относительном недостатке азота, нам удавалось обнаружить в культурах грибов на хинной кислоте только соответствующие фенольные производные; сахар в этих культурах в сколько-нибудь значительном количестве ни разу не был найден.

На вопрос, какие вещества образуются в качестве действительных промежуточных продуктов в живых клетках при потреблении ими различных углеродистых соединений, включая и углеводы, в настоящее время не может быть дан вполне определенный и достаточно обоснованный ответ» (1929а).

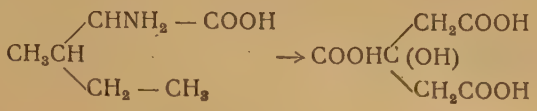
В ходе дальнейших исследований Буткевичу удалось показать, что органические кислоты играют важнейшую роль в основном обмене веществ в растениях. Благодаря его работам стало известно, что эти соединения связаны своим происхождением с окислительными превращениями углеводов, дающими в определенной стадии процесса продукты временной стабилизации.

Если многочисленным исследователям до работ Буткевича представлялось непонятным, почему в окислительном процессе у растений появляется временный перерыв и накапливаются продукты неполного окисления типа органических кислот, то экспериментальные исследования Буткевича совершенно точно разъяснили, что этот перерыв весьма важен в жизнедеятельности растительного организма. Органические кислоты могут служить не только материалом для дальнейшего окисления, но и основой для синтеза аминокислот, а также для последующего образования из них альдегидов, из которых далее синтезируются высокомолекулярные жирные кислоты и жиры. Они являются той промежуточной стадией, которая позволяет направлять процесс в самые различные стороны, связанные не только с дальнейшим распадом, но и с дальнейшим синтезом. Для аргументации этих положений нужно было детально расшифровать химизм образования и дальнейшего превращения ряда органических кислот, и эту задачу весьма обстоятельно разрешил Буткевич. Прежде всего ему удалось установить происхождение лимонной и щавелевой кислот. Как известно, по химизму образования этих кислот было высказано много гипотез, но большинство из них основывалось на недостаточном экспериментальном материале, а некоторые из них имели чисто спекулятивный характер.

Весьма широкое распространение в литературе получила, например, гипотеза, связывавшая образование лимонной кислоты с распадом белковых веществ грибного мицелия. Однако совершенно точными опытами Буткевичу удалось показать, что при распаде белковых веществ питательного субстрата в среде накапливается не лимонная, а щавелевая кислота. В связи с этим гипотезу образования лимонной кислоты из белковых веществ пришлось оставить, хотя С. П. Костычев и пытался модернизировать ее в дальнейшем таким образом, что допускал возможность ее образования не из белковых веществ, а из аминокислот, служащих исходными продуктами для образования «неудавшихся» белковых молекул. Так как из аминокислот по своей химической структуре всего ближе подходит к лимонной кислоте изо-лейцин, то Костычев и связал процесс образования лимонной кислоты с односторонним синтезом изо-лейцина, сопровождающимся последующим его окислением и дезаминированием. Свою точку зрения он формулировал следующим образом.

«Лимонная кислота с раздвоенной цепью вообще не может произой-

ти из сахара путем прямого окисления; образование этой кислоты из углеводов немыслимо без участия синтетических процессов. Наоборот, из звеньев белковой молекулы возможно и прямое образование лимонной кислоты, например, скелет изо-лейцина соответствует скелету лимонной кислоты



Но гораздо более правдоподобно, конечно, образование лимонной кислоты путем более глубокой переработки звеньев белковой молекулы. Происхождение распространенных кислот из белка вполне мыслимо и во многих случаях, конечно, на самом деле происходит. На этом основании и те случаи, когда органические кислоты образуются из углеводов, правильнее всего привести в связь с синтезом белков, при котором углеродные скелеты аминокислот строятся из сахара» (1933, стр. 384).

На эти соображения Костычева Буткевичч ответил своими исследованиями, которые дали факты, противоречащие этой гипотезе.

«Относительно такой трактовки образования лимонной кислоты нужно заметить, что представление об ее образовании за счет метаболизма белковых веществ протоплазмы при тех количествах, в которых эта кислота образуется в культурах грибов на сахаре, не может быть приведено в согласие с фактами, установленными нашими работами» (1941).

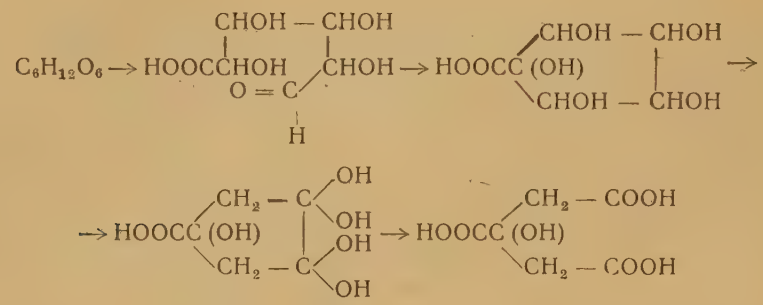
И эти факты, связанные главным образом с количественными выходами кислот, были столь убедительными, что в своей более поздней работе Костычев принужден был отказаться от своего взгляда и присоединиться к позиции Буткевича. «Безусловная заслуга Буткевича,— писал он в работе от 1927 г. (1927, стр. 181),— заключается в том, что он первый с несомненностью установил образование лимонной кислоты из сахара. Этим устраняется защищавшееся Мазе и Перье, а также Бухнером и Вюстенфельдом допущение относительно образования лимонной кислоты из азотистых составных частей плазмы».

Далее, после появления работы Буткевича совместно с автором этих строк об окислительной способности мукоровых грибов, в которой сообщались данные о синтетическом образовании янтарной кислоты из уксусной, появилась новая гипотеза образования лимонной кислоты из уксусной через стадию янтарной, фумаровой и яблочной кислот. Однако точными опытами Буткевича было показано, что появление лимонной кислоты при культуре гриба на уксуснокислых солях связано с превращением не уксусной кислоты, а запасных веществ мицелия. Помимо этого, им было показано, что в культурах на сахаре образование лимонной кислоты может достигать 90% от использованного сахара, в то время как гипотеза ее образования через уксусную кислоту не может объяснить выхода более 71%. Основываясь на этих опытах, Буткевич указывает: «Из этой совокупности проведенных опытов выяснилось, что уксусная кислота, вопреки выдвинутой схеме, не может служить непосредственным материалом для образования лимонной кислоты и что лимонная кислота, накопляющаяся при помещении грибных пленок на растворах ацетата, обязана своим происхождением веществам пленок, а именно, прежде всего находящимся в них сахарам. Роль ацетата сводится лишь к его защитному действию по отношению к лимонной кислоте, которая благодаря этому накопляется» (1939, стр. 295).

После этих работ Буткевича несостоятельность указанной гипотезы стала также совершенно ясной.

Таким же образом и в дальнейшем каждую новую гипотезу образования лимонной кислоты он подвергал тщательной экспериментальной

проверке, и строго подобранные факты обычно приводили к ее опровержению. Собственная же гипотеза Буткевича, связывавшая образование лимонной кислоты с окислением глюкозы без предварительного разрыва цепи углеродных атомов через глюкуроновую кислоту с последующим замыканием пятичленного кольца хотя и не доказана полностью, но, по крайней мере, она может объяснить любые количественные выходы этого продукта в культурах Aspergillus niger. Ход процесса превращения сахара в лимонную кислоту мыслится Буткевичем проходящим через следующие этапы:



Полученные при этих работах экспериментальные данные были широко использованы не только для теоретического решения вопроса, но и для практической организации заводского производства лимонной кислоты. По разработанному им методу сначала выращивают культуру Aspergillus niger на сахаре с минеральными солями (с включением 0,3% азотнокислого аммония), а затем из-под полученной пленки сливают раствор, промывают пленку кипяченой водой и наливают прокипяченный раствор сахара. Пленка гриба начинает быстро окислять сахар с выходом лимонной кислоты в 50—60% от потребленного сахара. Эта методика имеет до сих пор существенное производственное значение.

На основе изучения химизма образования ряда органических кислот получилась возможность дать оценку их происхождения и роли не только в культуре грибов, но и в растительных организмах вообще. Эта роль была определена Буткевичем следующим образом:

«Нет никакого сомнения в том, что многие органические кислоты, будучи промежуточным продуктом превращений, связанных, главным образом, с углеводным обменом, отчасти используются как строительный материал в процессах синтеза, если для этого имеются соответствующие условия, частью же разрушаются дальше, выполняя роль энергетического материала в процессе дыхания. При этом мы принимаем участие кислот в процессах синтеза вообще, не ограничивая этих процессов «ресинтезом углеводов», как это делает без достаточных оснований Беннет-Кларк.

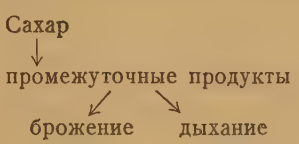
В ряде случаев, когда происходит окислительное превращение углеводов в кислоты без образования углекислоты, совершенно ясно, что эти превращения представляют процесс дыхания, являющийся источником энергии, за счет которого поддерживается жизнедеятельность клеток. В дальнейшем образующиеся кислоты могут подвергаться в свою очередь окислению, вплоть до углекислоты, являясь таким образом промежуточной ступенью в процессе дыхания. Там, где при дыхании не имеется столь обильного накопления кислот, как при ночном дыхании у суккулентов, это может обусловливаться дальнейшим потреблением кислот по мере их образования» (1939, стр. 286).

На основе многочисленных и разносторонних исследований Буткевича с сотрудниками над образованием и накоплением ряда органиче-

ских кислот в культурах микроорганизмов, а также исследований над продуктивностью развития различных микроорганизмов на разных источниках углерода получилась возможность сделать более широкие выводы и по общим вопросам физиологии растений.

В частности, возникла необходимость пересмотреть общие основы теории химизма дыхания в растительных организмах, поскольку полученные результаты определенно опровергали господствующие в физиологии представления об обязательном прохождении при окислительном превращении углеводов стадии расщепления по типу спиртового брожения. Это представление разделялось рядом крупных физиологов. Среди них можно указать имена Палладина, Костычева, Иоста, Бенеке и других.

«На основе многочисленных данных,— писал Костычев (1939, стр. 297) — автор этой книги построил теорию, к которой примкнуло большинство современных исследователей. Сущность теории заключается в том, что сахар разлагается сперва по схеме спиртового брожения, которое, однако, доходит до конца лишь в том случае, если организм обладает большей энергией брожения и слабой энергией окисления, как это наблюдается, например, у дрожжей и энергичных бродителей из группы мукоров. Но у типично аэробных организмов окислительных ферментов так много, что они нацело окисляют нестойкие промежуточные продукты брожения, не доведя дело до образования спирта. Такая связь брожения и дыхания иллюстрируется следующей схемой:



Близкую мысль высказывал Бенеке: «Нужно быть уверенным, что первые процессы при дыхании и брожении дают идентичные продукты. Брожение является вступлением к дыханию» (1924, стр. 363).

Однако своими многочисленными работами по образованию органических кислот плесневыми грибами Буткевич дал весьма ценные материалы, не укладывающиеся в схему двухфазного дыхания. Учитывая это, приверженцы двухфазной схемы дыхания сначала пытались совершенно устранить кислоты из углеводного обмена растений и тем самым снять самый вопрос об их отношении к этому обмену. Такого направления придерживались Рулянд и многие другие исследователи. Однако в ряде своих работ Буткевич показал, что образование многих кислот связано с несомненным превращением углеводов. Тогда сторонники двухфазной схемы дыхания попытались включить образование органических кислот из сахаров в господствующую схему, допуская и в ходе образования этих продуктов предварительное расщепление по типу спиртового брожения (Хрзонщ, Бернгауэр и др.). Однако и здесь исследования Буткевича показали, что этого типа процессы не имеют места.

Анализируя большой экспериментальный материал, посвященный этим вопросам, Буткевич приходит к выводу, что «при состоянии наших современных сведений в области, соприкасающейся с процессами дыхания, приходится признать, что теория связи интрамолекулярного дыхания с кислородным не только лишена каких-либо оснований, но и находится в прямом противоречии с рядом твердо установленных фактов. Но если при нормальном углеводном дыхании у аэробных организмов предварительное расщепление по типу спиртового брожения вообще не имеет места, то все же в некоторых особых случаях может проявиться известная связь между процессами такого рода расщепления и окислительными процессами. Со случаями такой связи можно встретиться в

клетках и тканях с относительно слабо выраженной окислительной системой, деятельность которой не сопровождается полным подавлением процессов брожения, или при несоответствии между потреблением и притоком кислорода, когда первое не покрывается последним, что, естественно, приводит к временным состояниям анаэробиозиса. И в том и в другом из указанных случаев, наряду с нормальными процессами дыхания, могут иметь место и процессы окисления продуктов брожения, поскольку в данных случаях оно сопровождает эти процессы, разыгрываясь с ними одновременно или вперемежку» (1941, стр. 108).

Не вдаваясь в детали рассмотрения всего относящегося к этим вопросам материала, мы можем указать, что Буткевич не только дал обстоятельную критику двухфазной теории дыхания, не только привел экспериментальные данные, не согласующиеся с ней, но и разработал новую теорию, изложенную им в одной из последних его работ «О химизме дыхания у растительных организмов» (1941, стр. 115). Главнейшие положения этой теории он сформулировал следующим образом:

«1. Представление о первой фазе дыхания как о расщеплении углеводов по типу спиртового брожения не соответствует действительности. На основе новейших данных следует полагать, что многие процессы осуществляются путем прямого окисления.

2. Промежуточными продуктами при дыхании очень часто являются органические кислоты, окисляющиеся далее до углекислоты и воды. Однако роль этих продуктов не сводится только к роли материала для сжигания, дающего организму энергию. Они могут использоваться организмами и в других направлениях. Один и тот же физиологический процесс может обслужить потребность организма в различных направлениях, и осложнение энергетических функций другими может явиться причиной ряда химических превращений, сопровождающих дыхание.

3. Сопряжение эндотермических реакций с экзотермическими в физиологических процессах не является безусловно обязательным. Возможно и произвольное течение эндотермических реакций с потреблением тепла окружающей среды.

4. Реакция окислительного превращения углеводов требует дальнейшего исследования с охватом всего разнообразия превращений. Поскольку эти исследования тормозились предвзятой точкой зрения на процессы дыхания, которая и до сих пор еще широко представлена в физиологии, следует оставить попытки уложить эти процессы в несоответствующую им упрощенную схему и заняться разработкой новой схемы дыхания, учитывающей новейшие успехи физиологии растений».

Справедливость этих слов очевидна. В истории науки мы имеем много примеров, когда предвзятые идеи действительно сильно тормозили развитие науки в тех областях, к которым они относились непосредственно. Призыв Буткевича оставить попытки уложить многообразие процессов дыхания в однообразную и упрощенную схему остается актуальным и сегодня, хотя современное развитие физиологии растений и микробиологии и показало, что все разнообразие процессов, имеющих место при дыхании, не может быть уложено ни в одну из этих схем. У различных живых организмов могут иметь место как различные процессы расщепления углеводов по типу анаэробного дыхания, так и различные процессы окисления их без предварительного разрыва цепи углеродных атомов, которые казались Буткевичу наиболее приемлемыми. В том и другом случае основное внимание исследователей привлекала химическая сторона явления. Однако она недостаточна для полного понимания явления. В системе живой протоплазмы химические изменения окисляемого субстрата связаны с участием особых каталитических агентов (ферментов), от участия которых сильно зависит направление процесса. В зависимости от набора участвующих в процессе ферментов и окислительно-восстановительных условий в протоплазме клетки разно-

образные химические превращения окисляемого субстрата могут принимать довольно разнообразные направления. В этих сложных процессах подвергаются активированию ферментами не только окисляемый субстрат, но и молекулярный кислород. Современные исследования дали твердое доказательство, что в ходе процесса аэробного дыхания активированный водород окисляемого вещества реагирует только с активированным кислородом, что требует участия дегидраз и оксидаз. Кроме того, выявилось, что скорость окисления находится в большой зависимости от так называемых промежуточных переносчиков активированного водорода и кислорода. Особенно важна их роль в качестве пространственных переносчиков, так как ферменты, активирующие водород или кислород (дегидразы и оксидазы), тесно связаны с протоплазмой клетки и, повидимому, фиксированы на ее структурных поверхностях. А если это так, то дегидраза, присоединив к себе водород окисляемого субстрата, может передать его другой дегидразе или же активированному оксидазой кислороду только в том случае, если в жидкой фазе протоплазмы имеются соответствующие переносчики водорода. Они первоначально акцептируют на себе этот водород, а затем уже, диффундируя в протоплазме клетки в разных направлениях, могут доставить его к соответствующему акцептору. Благодаря этому не только ускоряется процесс окисления, но он получает и черты специфичности, так как перенос водорода промежуточными переносчиками может осуществляться только от определенного донатора к определенному акцептору. В последнее время стало выясняться, что в ходе этих процессов весьма важное значение имеют щавелевоуксусная и фумаровая кислоты. Повидимому, водород от первичной дегидразы (пиридин-протеида) передается сначала щавелевоуксусной кислоте и восстанавливает ее в яблочную кислоту:

$$\begin{array}{l}\text{CO COOH}\\ |\\ \text{CH}_2\text{COOH}\end{array} + \text{дегидраза} - \text{H}_2 \rightarrow \begin{array}{l}\text{CHOHCOOH}\\ |\\ \text{CH}_2\text{COOH}\end{array} + \text{дегидраза}$$

От яблочной же кислоты водород переходит к вторичной дегидразе (флавин-протеиду) и восстанавливает ее:

$$\begin{array}{l}\text{CHOHCOOH}\\ |\\ \text{CH}_2\,\text{COOH}\end{array} + \text{вторичная дегидраза} = \begin{array}{l}\text{CO COOH}\\ |\\ \text{CH}_2\,\text{COOH}\end{array} + \text{вторичная дегидраза} - \text{H}_2$$

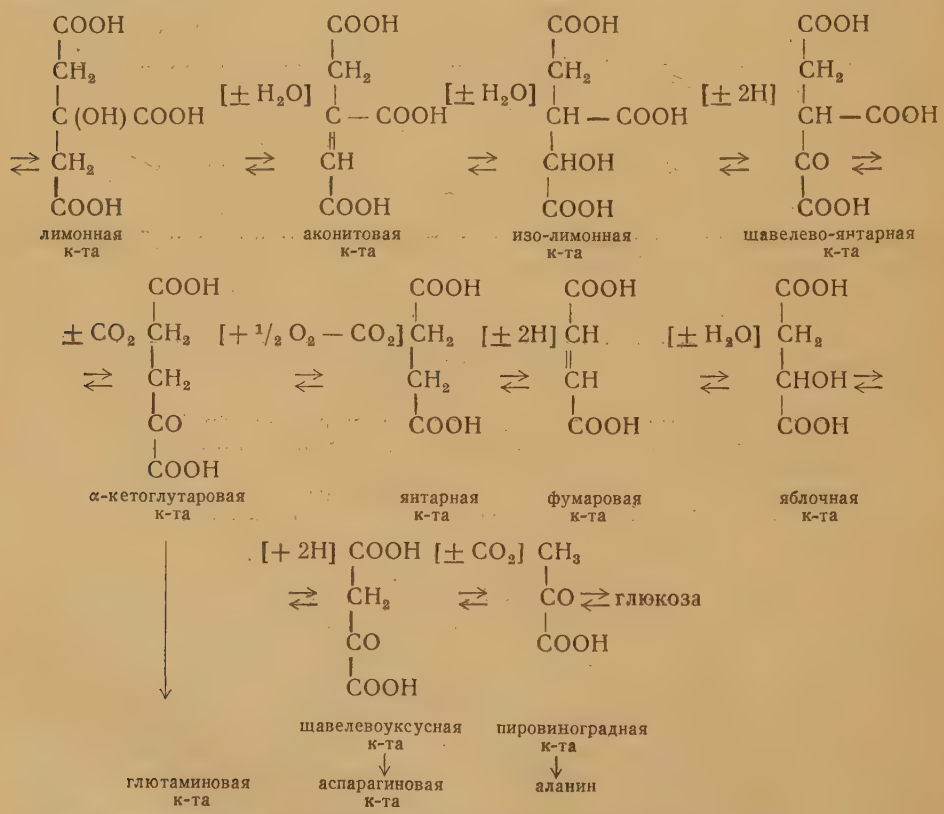
А вторичная дегидраза в свою очередь передает свой водород, видимо, фумаровой кислоте, восстанавливающейся в янтарную кислоту:

$$\begin{array}{l}\text{CH COOH}\\ \|\\ \text{CH COOH}\end{array} + \text{вторичная дегидраза} - \text{H}_2 \rightarrow \begin{array}{l}\text{CH}_2\,\text{COOH}\\ |\\ \text{CH}_2\,\text{COOH}\end{array} + \text{вторичная дегидраза}$$

И только от янтарной кислоты водород переходит к цитохрому и транспортируется далее к активированному кислороду. В результате получается довольно сложный путь окисления, но он имеет большой биологический смысл. Как известно, в протоплазме клетки могут реагировать между собой только близкие по окислительно-восстановительному потенциалу системы, а между тем окислительно-восстановительный потенциал геминного фермента, активировавшего молекулярный кислород, соответствует примерно + 600 mV, а окислительно-восстановительный потенциал первичной дегидразы отвечает приблизительно — —300 mV. При такой разнице окислительных потенциалов реакция между водородом, активированным первичной дегидразой, и кислородом, активированным геминферментом, была бы невозможной. Промежуточные же катализаторы и переносчики водорода постепенно устраняют этот раз-

рыв. Окислительный потенциал щавелевоуксусной кислоты равен — — 160 mV, а поэтому первичная дегидраза может передать свой водород щавелевоуксусной кислоте. Вторичная же дегидраза имеет окислительный потенциал около —60 mV и легко дегидрирует яблочную кислоту. Фумаровая же кислота имеет окислительный потенциал + 15 mV и легко может воспринять водород от вторичной дегидразы. Наконец, цитохром С имеет окислительный потенциал +260 mV и легко дегидрирует янтарную кислоту, образовавшуюся из фумаровой. Таким образом, в результате участия промежуточных катализаторов и переносчиков окислительные потенциалы постепенно сближаются и взаимодействие между активированным водородом и активированным кислородом становится возможным. Из этих данных легко видеть, что промежуточные переносчики устраняют не только пространственный разрыв, но и разницу в окислительном потенциале реагирующих систем. Все это говорит о сложности процесса дыхания и о невозможности уложить его в однообразную упрощенную схему.

Исследования последнего времени дали еще более исчерпывающие сведения о роли органических кислот в аэробном дыхании различных живых организмов. Оказалось, что ход процесса окисления связан с циклическим участием ряда органических кислот. Наиболее широкое участие принимают эти соединения в так называемом цикле трикарбоновых кислот или иначе в «лимоннокислотном цикле». Не имея возможности воспроизвести этот цикл полностью, укажем только наиболее важные этапы:



$(COOHCH_2CH_2CHNH_2COOH)$ $(COOHCH_2CHNH_2COOH)$ (CH_3CHNH_2COOH)

Такое значение органических кислот вскрыто только новейшими исследованиями, но оно в полной мере подтверждает мнение Буткевича, что роль органических кислот в растительном организме «не сводится толь-

ко к роли материала для сжигания, дающего организму энергию. Они могут использоваться организмами и в других направлениях». Многие из них действительно используются не только как материал для сжигания, но и как промежуточные переносчики активированного водорода при дыхании, а также как углеродные скелеты для образования различных аминокислот. Особенно существенной стала роль кетокислот после того, как Брауштейном и Крицман (1938, 1939 г.) было открыто явление переаминирования, осуществляющееся по следующей схеме:

$$R-COCOOH + \begin{matrix}CHNH_2COOH\\ |\\ CH_2COOH\end{matrix} \rightarrow \begin{matrix}R-C\\ |\\ COOH\end{matrix} \begin{matrix}:N\,CHCOOH\\ |\\ CH_2COOH\end{matrix} \xrightarrow{(-H_2O)} R-\begin{matrix}CHN:C-COOH\\ |\quad\;\;|\\ COOH\;CH_2COOH\end{matrix}$$

$$\xrightarrow{(+H_2O)} R-CHNH_2COOH + \begin{matrix}COCOOH\\ |\\ CH_2COOH\end{matrix}$$

В ходе этого процесса аминогруппа аспарагиновой кислоты возникающая, по данным наших исследований (1935 г.), а также других исследователей, за счет взаимодействия между аммиаком и фумаровой кислотой, может передаваться различным кетокислотам и превращать их в соответствующие аминокислоты. И в этом процессе синтеза составных частей белковой молекулы органическим кислотам принадлежит выдающееся место, и подтверждается справедливость мнения Буткевича об их важной физиологической роли в жизни растительных организмов.

Однако значение органических кислот в метаболизме углеродистых соединений не исчерпывается их участием в синтезе белковых веществ. Разнообразные соединения, участвующие в строении живой протоплазмы, также могут синтезироваться из органических кислот путем их декарбоксилирования и последующего синтетического изменения их. Поэтому роль этих соединений в физиологических процессах живой клетки весьма разнообразна и пути их превращения в протоплазме клеток весьма различны.

Все это говорит о важном значении исследований Буткевича по химизму превращения органических кислот в растительных организмах. Его представления о роли этих соединений в жизни клетки с каждым новым завоеванием в этой области науки получают все новые и новые подтверждения. По мере дальнейшего углубления наших знаний о механизме физиологических процессов в гетерогенной системе живой протоплазмы функции этих соединений будут все больше и больше возрастать, давая материал для новых и новых исследований. Возрастающий интерес к превращениям этих соединений в живых организмах вполне понятен, так как процессы распада и синтеза в живой протоплазме могут быть связаны с превращениями органических кислот.

Подобный тип превращений вовлекает эти соединения в циклические процессы в живом организме и это придает им еще большую значимость в его жизни. Поэтому следует признать, что Буткевич поступил вполне правильно, посвятив большую часть своих исследований изучению превращения именно этих соединений. Его классические работы по происхождению ряда органических кислот еще долгие годы будут служить образцом для тех исследователей, которые пожелают отдать свои знания и силы развитию этой главы физиологии растений.

Здесь мы остановились только на разборе теоретического значения чисто физиологических работ Буткевича. Однако это не означает, что его микробиологические работы, посвященные изучению распределения микроорганизмов в морской воде, изучению железобактерий, метановых бактерий, денитрифицирующих бактерий и ряда других организмов, имеют меньшее научное значение. В следующей статье мы попытаемся

эти разделы его исследовательской работы подвергнуть более детальному рассмотрению и научной оценке с точки зрения современных достижений микробиологической науки.

Получено 7.II.1950

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородин И., Untersuchungen über die Pflanzenathmung. Bot. Z. **36**, N 54, 1881.
2. Браунштейн А. и Крицман М. Переаминирование между амино- и кетокислотами при участии дикарбоновых кислот, Биохимия **3**, 1938; **4**, 1939.
3. Буткевич В. С. Об эмульсине. Изд. Моск. с.-х. ин-та, 1897.
4. Буткевич В. С. Энзимы и их распространение в растительном царстве. Москва, 1898.
5. Буткевич В. С. Протеолитический фермент прорастающих семян. Журн. опытной агрономии, 1900, две статьи.
6. Буткевич В. С. Über proteolyt. Enzyme gekeimter Samen. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **18**, 1900.
7. Буткевич В. С. Vorkommen proteolyt. Enzyme in gekeimten Samen. Z. Physiol., H. 32, 1901.
8. Буткевич В. С. Umwandlung der Eiweiss-Stoffe durch die Pilze im Zusammenhang mit einiger Bedingungen ihrer Entwicklung. Jahrb. Wiss. Bot., **38**, 1902.
9. Буткевич В. С. Превращение белковых веществ грибами. Тр. СПб. об-ва естествоиспыт., **33**, 1903.
10. Буткевич В. С. Регрессивный метаморфоз белковых веществ в высших растениях и участие в нем протеолитического фермента, Москва, 1904.
11. Буткевич В. С. Ammoniak als Umwandlungsprodukt stickstoffhaltiger Stoffe in höheren Pflanzen. Bioch. Z., 16. 1909. S. 41. 1912.
12. Буткевич В. С. Аммиак как продукт превращения белковых веществ плесневыми грибами и условия его образования. Сб. им. К. А. Тимирязева, 1916.
13. Буткевич В. С. Bildung von Oxalsäure und Ammoniak in den Kulturen Asperg. niger auf Pepton. Biochem. Z., **129**, 1922.
14. Буткевич В. С. Ausnutzung des Peptons als Kohlenstoffquelle durch die Citromyces-Arten. Там же, **129**, 1922.
15. Буткевич В. С. Bildung und Aufhäufung v. Oxaläure in den Citromyces-Kulturen auf den Salzen der organischen Säuren. Там же, **129**, 1922.
16. Буткевич В. С. Bildung v. Citronen u. Oxalsäure in den Citromyces-Kulturen auf den Salzen d. organischen Säuren. Там же, **129**, 1922.
17. Буткевич В. С. Verbrauch und Bildung v. Citronensäure in den Kulturen d. Citromyces auf Zucker. Там же, **131**, 1922.
18. Буткевич В. С. (с Орловой). Zur Frage nach den ökonomischen Koeffizienten bei Asperg. niger. Там же, **132**, 1922.
19. Буткевич В. С. Bildung v. Citronensäure in den Kulturen v. Asperg. niger und Penicillium glaucum auf Zucker. Там же, **136**. 1923.
20. Буткевич В. С. Ueber die Citronensäuregärung. Там же, *142*, 1923.
21. Буткевич В. С. Umwandlung v. Chinsäure durch die Pilze. Там же, **145**, 1924.
22. Буткевич В. С. Bildung von Glucosa mit Citronensäure in den Pilzkulturen auf Zucker. Там же, **154**, 1924.
23. Буткевич В. С. Chinasäure verwertender Pilze und Bakterien. Там же, **159**, 1925.
24. Буткевич В. С. Кислоты как промежуточный член окислительного превращения сахара грибами. Научно-агрон. журн., 1925.
25. Буткевич В. С. Die Säure als Zwischenglied der oxydativer Umwandlung des Zuckers durch die Pilze. Jahrb. wiss. Botanik, **64**, 1925.
26. Буткевич В. С. Ein neues Produkt der Zuckerumwandlung bei den Pflanzen. Planta (Z. wiss. Botanik, **1**, 1926).
27. Буткевич В. С. Об образовании кислот у грибов. Журн. эксперим. биологии и медицины. 1927.
28. Буткевич В. С. Бензольные производные как промежуточная ступень при использовании грибами хинной кислоты. Тр. Тимирязевского биолог. ин-та, 1929.
29. Буткевич В. С. (с М. В. Федоровым). Bildung von Fumarsäure in den Zuckerkulturen von Mucor stolonifer und sein Verhalten zu Brenztraubesäure. Biochem. Z., 206, 1929.
30. Буткевич В. С. (с Федоровым). Umwandlung der Essigsäure durch Mucor stolonifer in Bernstein- und Fumarsäure mit dem Verfahren zur Bestimmung dieser Säuren. Там же, **207**, 1929.
31. Буткевич В. С. (с Федоровым). Verhältnisse zwischen Essig-, Bernstein-, Fumar- und Oxalsäure in den Kulturen von Mucor stolonifer und einigen anderen Pilzen. Там же, **219**, 1930.
32. Буткевич В. С. (с Федоровым). Umwandlung und Athylalkohol in den Kulturn v. Mucor stolonifer. Там же. 219, 1930.

33. Буткевич В. С. К вопросу о биохимическом происхождении растительных кислот. Микробиология, 1, 1932.
34. Буткевич В. С. (с Бариновой). Материалы по организации производства лимонной кислоты при помощи культуры Aspergillus niger. Тр. Центр. научно-иссл. биохим. ин-та пищевой и вкусовой промышленности, II, вып. 5, 1932.
35. Буткевич В. С. (с Менжинской и Трофимовой). Об участии уксусной кислоты в образовании лимонной. Микробиология, III, вып. 3, 1934.
36. Буткевич В. С. (с Менжинской и Трофимовой). Вещества мицелия как источник образования кислот. Микробиология, III, вып. 4, 1934.
37. Буткевич. В. С. Об образовании щавелевой кислоты грибами и об участии в нем вещества мицелия. Микробиология, III, вып. 4, 1934.
38. Буткевич В С. Zur biochemischen Herkunft v. Citronen- und Oxalsäure. Bioch. Z., 272, 1934.
39. Буткевич В. С. (с Тимофеевой). Влияние отдельных элементов питательной среды на образование кислот грибов Aspergillus niger. Микробиология, III, вып. 4, 1934, и IV, вып. 4, 1935.— Три статьи.
40. Буткевич В. С. (с Менжинской и Трофимовой). Zur biochemischen Herkunft v. Citronen- und Oxalsäure. Bioch. Z., 276, 1935.
41. Буткевич В. С. (с Менжинской и Трофимовой). Zur biochemischen Herkunft v. Citronen- und Oxalsäure. Там же, 276, 1935.
42. Буткевич В. С. (с Трофимовой). Einfluss einzelnen mineralischen Elemente des Nährmediums an d. Säurebildung bei Asperg. niger. Там же, 275, 1935.
43. Буткевич В. С. (с Гаевской). Выходы лимонной кислоты из сахара как основание для оценки схем ее образования из последнего. ДАН СССР, XIII, № 7, 1935.
44. Буткевич В. С. (с Осницкой). Влияние ацетата на потребление грибными пленками янтарной кислоты. ДАН СССР, XIII, № 8—9, 1935.
45. Буткевич В. С. (с Осницкой). Участие муравьиной кислоты в биохимическом образовании щавелевой. ДАН СССР, XIV, № 9, 1936.
46. Буткевич В. С. К вопросу об образовании щавелевой и лимонной кислот грибами. Там же, XIV, № 9, 1936.
47. Буткевич В. С. (с Мельниковой). Свекловичный сок как материал для получения биохимическим путем лимонной кислоты. Микробиология, V, вып. 2, 1936.
48. Буткевич В. С. (с Мельниковой.) Влияние нитратного и калийного ионов на накопление лимонной кислоты грибом Aspergillus niger. Там же, V, вып. 3, 1936.
49. Буткевич В. С. (с Бариновой). Влияние моноиодуксусной кислоты на спиртовое брожение и образование кислот у Aspergillus niger. Микробиология, V, вып. 9, 1936.
50. Буткевич В. С. (с Соболевской). К вопросу об образовании лимонной кислоты в листе махорки. ДАН СССР, XV, № 3, 1937.
51. Буткевич В. С. Окислительные превращения углеводов растительными организмами. Тр. Московского Дома ученых, вып. V. Современные достижения и задачи физиологии растений, 1937.
52. Буткевич В. С. (с Менжинской и Тимофеевой). Глюкуроновая кислота как промежуточная ступень при биохимическом образовании лимонной кислоты из сахара. ДАН СССР, XVIII, № 9, 1938.
53. Буткевич В. С. К вопросу о промежуточных ступенях биохимического превращения сахара в лимонную кислоту. Там же, XVIII, № 9, 1938.
54. Буткевич В. С. Окислительные превращения углеводов растительными организмами. Тр. Моск. Дома ученых. Вып. 1. Современные достижения и задачи физиологии растений. 1937.
55. Буткевич В. С. (с Трофимовой). К вопросу об участии уксусной и яблочной кислот в биохимическом образовании лимонной кислоты. Микробиология, VII, вып. 9—10, 1938.
56. Буткевич В. С. Растительные кислоты как продукт превращения углеводов грибами. Микробиология, VIII, вып. 3—4, 1939.
57. Буткевич В. С. (с Мельниковой). Биохимическое образование щавелевой кислоты из сахара. Там же, VIII, вып. 7, 1939.
58. Буткевич В. С. К современному состоянию вопроса о химизме процессов дыхания у растительных организмов. Сб. работ по физиологии растений памяти К. А. Тимирязева. Изд. Акад. Наук СССР, стр. 9—118, 1941.
59. Костычев С. П. Физиология растений т. I, 1933.
60. Костычев С. и Чесноков. Planta Archiv für wiss. Bot. Bd. 4, 181, 1927.
61. Федоров М. В. К вопросу о химизме биологического синтеза аминосоединений. Тр. ВИУАА, Сб. Микробиология почвы, 1, 1935.
62. Benecke W. und Jost L. Pflanzenphysiologie, Bd. I, 1924.
63. Pfeffer W. Pflanzenphysiologie, Bd. I, 1897.

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Г. М. Бошьян. **О природе вирусов и микробов.** Медгиз. Москва, 1949, 146 стр.

Мичуринская биологическая наука своим блестящим успехом обязана в первую очередь тому, что при решении стоящих перед ней задач она руководствуется методом диалектического материализма. В то же время мичуринская наука все более обогащает диалектический материализм новыми данными. Руководящие идеи товарища Сталина сыграли решающую роль в деле успешного развития творческой мичуринской биологии. Победа передового мичуринского учения над реакционным вейсманизмом-морганизмом открыла перед советскими биологами широкие перспективы для творческой деятельности, для ускоренного продвижения вперед научно-теоретических работ.

Основной особенностью мичуринского учения является ее творческий характер, позволяющий исследователю, овладевшему этим учением, все глубже проникать во все явления живой природы, все глубже познавать ее тайны и тем самым дальше развивать это учение. Товарищ Сталин учит, что нельзя двигаться вперед и двигать вперед науку без того, чтобы не подвергнуть критическому разбору установившиеся положения и высказывания известных авторитетов.

Руководствуясь этими указаниями своего вождя, советские ученые смело и решительно пересматривают многие устаревшие научные представления, мешающие движению вперед, создают и развивают взамен них новые, прогрессивные направления во всех областях науки.

Подлинный прогресс в науке возможен только на основе революционно-критического подхода к существующим положениям, на основе постоянного обобщения нового опыта, на основе борьбы мнений, невзирая на авторитеты и «традиции».

Недавно вышедшая книга Г. М. Бошьяна «О природе вирусов и микробов» может служить примером такого новаторства в науке. Данные этой работы заставляют подвергнуть коренному пересмотру ряд установившихся в биологии, в частности микробиологии, положений.

В своей книге автор кратко излагает результаты многолетних исследований, выполненных им совместно с группой сотрудников, по всестороннему изучению природы фильтрующихся вирусов — возбудителей инфекционных заболеваний.

Проблема фильтрующихся вирусов имеет исключительно важное практическое и теоретическое значение. Достаточно хотя бы указать на то, что заболевания, вызываемые фильтрующимися вирусами среди людей и животных, значительно превалируют над инфекционными заболеваниями бактериальной этиологии. Вирусные болезни наносят также огромный ущерб и растениеводству.

В настоящее время, как указывает автор, насчитывается более двухсот заболеваний вирусной этиологии. Очевидно, что разработка научно-обоснованных мероприятий по диагностике, профилактике и лечению вирусных заболеваний имеет народнохозяйственное значение первостепенной важности. Чем полнее и достовернее наши знания о природе и свойствах фильтрующихся вирусов, тем эффективнее наши мероприятия по борьбе с вызываемыми ими заболеваниями. Независимо от этого, проблема вирусов имеет важнейшее теоретическое значение для всей биологической науки. Это определяется тем, что фильтрующиеся вирусы как наиболее просто организованные из известных нам живых существ представляют весьма удобный объект для решения ряда общебиологических вопросов, как то: о возможных формах существования живых организмов, о происхождении жизни и др.

Отличительной особенностью работы Г. М. Бошьяна является удачное сочетание одновременного успешного разрешения больших практических и теоретических вопросов. Особенно подробно автором изучена и описана в рецензируемой работе природа возбудителя инфекционной анемии лошадей. Это заболевание является одним из наиболее вредоносных, против которого долгое время не удавалось найти ни эффективных мер специфической профилактики и лечения, ни быстрых и точных специфических способов диагностики, в особенности скрытых форм. Считалось, что возбудителем инфекционной анемии является фильтрующийся вирус. Но важнейшие для практики вопросы о свойствах возбудителя и о путях его распространения оставались неизвестными.

В результате десятилетней упорной работы по получению очищенного вируса инфекционной анемии и всестороннему изучению его свойств автору удалось открыть видимую форму возбудителя инфекционной анемии путем превращения вируса в его микробную форму. Это в свою очередь позволило выяснить распространенность вируса анемии лошадей в природе, вирусоносительство и изыскать эффективные специфические средства диагностики, профилактики и терапии этого заболевания. Одно это

уже представляет весьма существенный вклад в нашу советскую науку. Но главное в работе Г. М. Бошьяна заключается в том, что им по-новому поставлен и разрешен вопрос о самой природе фильтрующихся вирусов и о связи их с микробами. Более того, что следует особо подчеркнуть, правильное разрешение основного теоретического вопроса о природе фильтрующихся вирусов помогло автору успешно разрешить практические задачи. Применив разработанные им при изучении инфекционной анемии принципы при исследовании возбудителей ряда других инфекций — псевдочумы птиц, чумы свиней, ящура, энцефаломиэлита лошадей, бешенства, сыпного тифа и др.,— автор установил наличие общей закономерности выделения видимых микробных форм, представляющих определенную форму существования тех вирусов, которые вызывают указанные инфекции. Далее автору удалось доказать, что в ряде случаев так называемые «микробы-спутники», которым обычно отводилась роль вторичной инфекции, являются видимой формой возбудителя того вирусного заболевания, при котором они встречаются.

О природе фильтрующихся вирусов существовал и до сих пор существует ряд точек зрения. Многие исследователи считают, что фильтрующиеся вирусы, и в том числе и бактериофаг, являются неживыми веществами, порожденными живой клеткой. Другие рассматривают фильтрующиеся вирусы как паразитический белок, занимающий промежуточное положение между живым и неживым. Точка зрения, что вирус — неживое вещество или же паразитический белок, особенно широкое распространение имела по отношению к вирусам растений, у которых, как известно, некоторые вирусы получены в кристаллическом виде.

Многие исследователи, которые признают живую природу фильтрующихся вирусов, в то же время подчеркивают существенную разницу не только между фильтрующимися вирусами и бактериями, но и между фильтрующимися вирусами и фильтрующимися формами бактерий.

Наличие у бактерий фильтрующихся форм известно давно. Многочисленными исследованиями советских и зарубежных авторов доказана возможность получения фильтрующихся форм у многих патогенных и сапрофитных микроорганизмов. Но общее между фильтрующимися формами бактерий и фильтрующимися вирусами большинство исследователей видело только в том, что те и другие проходят через бактериальные фильтры.

Фильтрующиеся формы бактерий культивируются на многих искусственных питательных средах и их сравнительно легко вернуть в видимую форму бактерий. Фильтрующиеся вирусы рассматривались как совершенно автономные существа, которые способны к существованию только в клетках животных и растений. Даже те отдельные авторы, которые допускали происхождение фильтрующихся вирусов от бактерий, рассматривали их как существа, ставшие настолько автономными и настолько приспособленными в течение многих тысячелетий к патогенной жизни, что они не могут уже жить вне организма животного или растения. Поэтому эти авторы не допускали возможности сближения в настоящее время вирусов с микробами. Другими же исследователями микробное происхождение фильтрующихся вирусов полностью отрицается. Эти авторы считают, что вирусы возникли независимо от микробов и представляют самостоятельные таксономические единицы. Мнение об автономности фильтрующихся вирусов укреплялось потому, что ученые долгое время не располагали методом выделения их из клеток тех высших организмов, в которых они обитают. Это привело к неоправданному обособлению вирусологии от бактериологии. Еще Д. И. Ивановский, основоположник современного учения о фильтрующихся вирусах, доказывал возможность размножения вируса мозаичной болезни табака на искусственных питательных средах.

Г. М. Бошьян на примере вируса инфекционной анемии лошадей и ряда других вирусов показал, что трудность получения микробной формы из фильтрующейся бактерии заключается в том, что вирус, как правило, весьма прочно связан с белками того организма, в котором он находится. Поэтому сразу выделить вирус не удается. Необходимо сначала нарушить связь между вирусом и белками организма, и тогда удается через ряд превращений получить видимую бактериальную форму.

Своими исследованиями Г. М. Бошьян показывает, что переход бактерий в фильтрующиеся вирусы, а также переход вируса в бактериальную форму не только возможен, но вполне закономерен и зависит от условий среды. Определяющими факторами при этих превращениях является среда.

Таким образом, работа Г. М. Бошьяна заставляет подвергнуть коренному пересмотру установившиеся традиционные представления:

1) об автономности фильтрующихся вирусов;

2) о наличии резкой демаркационной линии между фильтрующимися вирусами (истинными вирусами, как их некоторые считают) и фильтрующимися формами бактерий;

3) об отсутствии связи между фильтрующимися вирусами и бактериями;

4) о самостоятельном возникновении как бактерий, так и фильтрующихся форм.

Исследования Г. М. Бошьяна имеют также существенное значение для правильного понимания большой теоретической важности вопроса о возможных формах существования жизни. Является ли клетка основной формой существования жизни или возможны и имеются живые существа, не имеющие структуры клетки?

Известно, что открытие клетки Шлейденом и Шванном Энгельс рассматривал как одно из тех великих открытий, которые имели решающее значение в развитии естествознания и в укреплении диалектико-материалистического воззрения на природу.

Клеточная теория являлась важнейшим теоретическим обобщением в биологии и служила убедительным доказательством единства живой природы. Эта теория, наряду с открытием закона сохранения энергии и эволюционным учением Дарвина, имела важнейшее, решающее значение в борьбе с метафизическими и идеалистическими воззрениями на природу.

«Только со времени этого открытия стало на твердую почву исследование органических, живых продуктов природы — как сравнительная анатомия и физиология, так и эмбриология.

Покров тайны, окутывавший процесс возникновения и роста и структуру организмов, был сорван» [1].

Основоположники клеточной теории Шванн и Шлейден не смотрели на клетку как на единственно возможную форму существования организмов. Они выдвинули теорию о происхождении животных и растительных клеток из живой бесструктурной массы. Несмотря на это, многие реакционные ученые еще в середине прошлого века приложили немало усилий к тому, чтобы превратить клеточную теорию, основанную на идее развития, в застывшую метафизическую догму.

Одним из наиболее видных представителей этого идеалистического направления был ярый антидарвинист и реакционер — немецкий патолог Вирхов, основоположник так называемой клеточной (целлюлярной) патологии. Основные положения учения Вирхова гласят: «каждая клетка только от клетки», «вне клетки нет жизни», «жизнь начинается только с клетки», «организм есть сумма клеток».

Эти положения Вирхова, полностью отрицающие идеи развития и являющиеся основой для вейсманизма-морганизма, почти в течение века господствовали в разных разделах биологии, в том числе и в микробиологии. Они долго рассматривались как незыблемые и этим задерживали продвижение науки вперед. Многолетние работы О. Б. Лепешинской и ее сотрудников, обобщенные в ее труде «О происхождении клеток из живого вещества и роль живого вещества в организме» [2], полностью опровергают метафизические и идеалистические догмы вирховианцев. На большом фактическом материале О. Б. Лепешинская доказала, что образование новых клеток в организме происходит не только путем размножения имеющихся клеток, но и путем развития их из бесструктурного живого вещества. Это значит, что способностью развития обладают не только клетки, но и клеточно-неорганизованное живое вещество.

Мичуринская биологическая наука и теория развития, разработанная акад. Т. Д. Лысенко, полностью подтверждают наличие в живых организмах живого вещества. Вегетативная гибридизация может служить одним из наиболее убедительных доказательств правильности этого положения. Ведь при вегетативной гибридизации влияние ментора на другой прививочный компонент осуществляется не клетками, а соками растения, которые превращаются в клетки, обладающие свойствами ментора.

Существенный вклад в теорию развития, в частности в проблему о возможных формах существования живых существ, вносят исследования Г. М. Бошьяна. Эти исследования находятся в прямой связи с указанными выше работами О. Б. Лепешинской и являются логическим продолжением их. Г. М. Бошьян своими данными о природе микроорганизмов, являющихся сравнительно более просто организованными существами, подтверждает всю несостоятельность учения Вирхова. Своими опытами по превращению фильтрующихся вирусов в микробные клетки он наглядно показал, что клетка не является последней границей деления микроорганизма. Развитие доклеточных форм, таких, как вирусы, в клеточные организмы убедительно говорит о существовании предклеточной стадии развития. Это следует считать большим вкладом в науку. Благодаря работам О. Б. Лепешинской и Г. М. Бошьяна мы знаем, что клетки могут возникнуть не только из клеток, но и из бесструктурного живого вещества. Более того, из работ Г. М. Бошьяна мы теперь располагаем данными о возможности возникновения живых структур из бесструктурного способного кристаллизоваться белка — из нуклеопротеидных кристаллов, что подводит нас непосредственного к пониманию процесса возникновения живого вещества из неживого.

Без признания возможности возникновения клетки из живого вещества, не имеющего клеточной структуры, а последнего — из бесструктурного способного кристаллизоваться белка, который в свою очередь возникает от неживого вещества, нельзя правильно понять развитие самой живой природы. Это очень важно не только для понимания онтогенеза, но и филогенеза. Если придерживаться точки зрения, что начало живого только от клетки, то никак нельзя объяснить ни развитие индивидуального организма, ни развитие вообще. В возникновении и развитии живой природы мы отмечаем определенные этапы: возникновение из неорганического вещества

---

[1] Ф. Энгельс, Диалектика природы, стр. 157.

[2] О. Б. Лепешинская, О происхождении клеток из живого вещества и роль живого вещества в организме, АМН, Москва, 1950.

живого вещества; развитие живого вещества в клетку; из клетки — многоклеточные организмы.

Мичуринская биология учит нас, что жизнь это — процесс, заключающийся в единстве организма и условий его жизни. В организме живое вещество постоянно образуется из неживого.

В работе Г. М. Бошьяна мы находим указания на возможность возникновения живого из неживого и в настоящее время. Поэтому мы можем представить себе процесс самозарождения живого из неживого не только в давно прошедшие времена, но и в настоящее время.

Вопрос о происхождении жизни во все времена имел не столько «чисто научное» значение, сколько общественно-политическое — мировоззренческое. Борьба вокруг этого вопроса в конечном счете всегда сводилась к борьбе двух основных направлений в биологии — идеализма и материализма. Известный спор между сторонниками самозарождения (гетерогенистами — Пуше, Жоли, Мюссе, Бастиан), с одной стороны, и Пастером — с другой, носил явно политический характер. Известно, что вокруг Пастера группировались противники материализма — церковники и реакционеры. Идеи Пуше встречали сочувствие и горячую поддержку со стороны всех прогрессивных сил того времени. Отдавая должное великим открытиям и заслугам Пастера и значению его работ для развития микробиологии, необходимо все же согласиться, что данные Г. М. Бошьяна опровергают результаты опытов Пастера, которые ставились с целью доказать невозможность самозарождения. Исследования Г. М. Бошьяна вносят новые, существенно важные представления о границах устойчивости жизни микроорганизмов. Пуше не удалось практически доказать верность своих положений, хотя он стоял методологически на более правильных позициях, чем Пастер. Если на основании современных данных микробиологии мы можем сказать, что опыты Пуше ставились с методической стороны не безукоризненно и являлись поэтому не вполне убедительными, то на основании новейших данных о границах устойчивости микроорганизмов этот упрек с неменьшим основанием можно сделать и Пастеру. Мы все знаем, как Энгельс оценивал опыты Пастера. Он писал: «Опыты Пастера в этом отношении бесполезны: тем, кто не верит в возможность самозарождения, он никогда не докажет одними этими опытами невозможность его. Но они важны, ибо проливают много света на эти организмы, их жизнь, их зародыши и т. д.» [3].

Новейшие данные микробиологии вскрывают много нового, неизвестного во времена Пастера, в вопросе познания свойств микроорганизмов. Так, например, давно доказано, что многие питательные среды, в особенности агаризованные, после стерилизации в автоклаве при 120° являются условно стерильными. При продолжительном выдерживании их при температуре 37° на этих средах никаких признаков роста нет. Стоит только выдерживать такие среды при более высоких температурах (55—60° и выше), как на них появляется рост микроорганизмов. На это можно возразить, что в данном случае мы имеем дело с термоустойчивыми спорами термофилов. Невольно напрашивается вопрос: почему же другие формы существования микроорганизмов не могут быть еще более устойчивыми?

В своей работе Г. М. Бошьян сообщает, что некоторые фильтрующиеся формы бактерий обладают очень высокой устойчивостью, превосходящей устойчивость спор. Г. М. Бошьян считает, что фильтрующаяся форма является наиболее устойчивой формой существования микроорганизмов, обеспечивающая им сохранение вида. Сообщенные автором факты о выделении живых микробов из препаратов, которые ранее считались стерильными (туберкулин, маллеин, анатоксин и др.), также опровергают обычные представления о границах устойчивости микробов. Отсюда следует, что назрела необходимость коренным образом пересмотреть существующие представления о границах устойчивости микроорганизмов и внести существенные коррективы в выводы из опытов Пастера.

Особо важное значение для микробиологов самых разнообразных отраслей этой специальности имеет неоднократно подчеркиваемое Г. М. Бошьяном положение, что в процессе превращения фильтрующихся форм в видимую исходную форму мы получаем ряд атипичных форм, резко отличающихся от исходных. Только при определенных условиях выращивания из атипичных форм могут быть получены исходные.

Фильтрующиеся формы при первоначальном выращивании их в определенных условиях дают сперва образование видимых форм, отличных от исходных форм своими культуральными, морфологическими, серологическими, вирулентными и другими свойствами. Так, некоторые атипичные формы могут быть невирулентными, но в то же время обладать высокими иммуногенными свойствами. Это открывает перед исследователями широкие возможности получения наиболее эффективных для разнообразных нужд народного хозяйства форм микроорганизмов и для направленного изменения их свойств.

Для того чтобы направленно изменить те или иные свойства организма, нам необходимо знать, как исторически в процессе развития данного организма эти свойства образовались.

---

[3] Ф. Энгельс, Диалектика природы, стр. 242, изд. 1948.

Исходя из основного положения мичуринской биологии о единстве организма и условий его существования, необходимо детальное изучение индивидуального развития организма проводить в органической связи с условиями его существования.

В своем онтогенезе микроорганизм повторяет свой филогенез (от формы бесструктурного белка до клетки). Познав этот процесс индивидуального развития и связь его с условиями жизни, мы познаем его наследственные свойства. Овладев этим процессом, мы можем не только сознательно отобрать и закрепить ту форму (стадию), при которой организм обладает наиболее желательными для целей исследователя свойствами, но и направленно изменять наследственные свойства организмов и создавать организмы с нужными для нас свойствами, т. е. управлять процессом формообразования. В условиях эксперимента представляется возможным те или иные процессы развития, для которых в природных условиях потребовались длительные периоды времени, воспроизвести в значительно более короткие сроки.

Нельзя не согласиться с мнением Г. М. Бошьяна, что, «изучая закономерности превращения одних форм в другие и овладев этими закономерностями, мы можем и должны ускорить процессы превращения для того, чтобы изменить эти формы в нужном нам направлении» (стр. 75). Всесторонняя дальнейшая разработка этого положения на разнообразном микробиологическом материале, безусловно, обогатит нашу науку новыми интересными и ценными данными.

Рецензируемая книга не лишена и многих недостатков.

Существенным недостатком является то, что некоторые разделы книги изложены слишком схематично. Автор не приводит описания разработанной им особой методики получения на искусственных питательных средах из фильтрующегося вируса его микробной формы.

Наименее разработанными являются вопросы об иммунитете, о природе бактериофага и о природе антибиотиков. Между тем эти вопросы имеют весьма существенное значение. Если раньше считалось, что при всех вирусных заболеваниях и при некоторых бактериальных заболеваниях мы, как правило, имеем нестерильный иммунитет, то исследования Г. М. Бошьяна приводят нас к выводу, что при любой инфекции иммунитет является нестерильным. Это положение автор подтверждает выделением живых культур из аллергенов, токсинов, сывороток и т. д. Сущность иммунитета автором сводится к тому, что микробы превращаются в организме в фильтрующуюся форму, которая связывается с белками организма. Роль, которую автор отводит самому организму в деле выработки иммунитета, незначительна, она сводится преимущественно к определенной реакции ретикуло-эндотелиальной системы. Но ведь состояние иммунитета — это сложная реакция макроорганизма в целом, и в первую очередь центральной нервной системы, на вторжение инфекции, на что никаких указаний в работе Г. М. Бошьяна мы не находим.

Автор считает, что антибиотические вещества представляют собой фильтрующуюся форму тех микробов, из которых они получены. Непонятно, почему способность антибиотиков задерживать рост бактериальных клеток является доказательством их живой природы (стр. 125).

Автору удалось выделить из пенициллина, стрептомицина и ауромицина продуцентов этих антибиотиков. Это еще не может служить убедительным доказательством живой природы указанных антибиотиков. В связи с данными автора о значительной устойчивости различных форм микроорганизмов, не исключена возможность, что в препаратах имелись фильтрующиеся формы или другие способные к прорастанию формы продуцентов. Нам в настоящее время известна химическая структура многих антибиотиков, в составе которых нет ни одного атома азота. Так, например, клавацин, продуцируемый Asp. clavatus и некоторыми другими грибами рода Penicillium, имеет эмпирическую формулу $C_7H_6O_4$, фумигатин, продуцируемый Asp. fumigatus, имеет эмпирическую формулу $C_8H_8O_4$, цитринин, продуцируемый Penic. citrinum,— $C_{13}H_{14}O_5$. Число этих примеров можно значительно увеличить. Трудно представить себе живое вещество такой структуры. Навряд ли вообще возможно все разнообразные известные нам антибиотические вещества отнести к живым формам.

Из недостатков в работе Г. М. Бошьяна следует отметить также то, что автором совершенно не использован метод электронной микроскопии, который, безусловно, дал бы много интересного и нового при изучении процесса перехода фильтрующихся форм в видимые формы.

В книге совершенно не приводится основная литература по затрагиваемым в ней вопросам. Нет даже литературного указателя тех советских авторов, на работы которых имеются (к сожалению, весьма короткие) ссылки в тексте. Кроме того, нет указаний на ряд опубликованных исследований советских ученых, (Гамалея, Сукнев, Крестовникова, Утенков, Тимаков, Жуков-Вережников и многие другие), которые по отдельным вопросам развивают идеи, к которым вплотную примыкают идеи, развиваемые автором. У читателя, не знакомого с историей того или иного вопроса и ролью советских ученых в его разработке, может создаться впечатление, что эти вопросы впервые поставлены и разрешены автором (например, о нестерильном иммунитете, о фильтрующихся формах бактерий, о роли бактерий-спутников и др.).

Однако отдельные, отмеченные нами недостатки нисколько не умаляют того большого значения, которое будет иметь книга Г. М. Бошьяна в целом.

Работа Г. М. Бошьяна является серьезным вкладом в нашу мичуринскую биологическую науку. Открытие автора имеет принципиальное значение не только для работающих в области общей, медицинской, ветеринарной микробиологии и для фитопатологии. Книга будет иметь также существенное значение для работающих в области почвенной, бродильной, водной и других разделов микробиологии. Книга открывает новые широкие перспективы для всестороннего изучения природы микроорганизмов и для овладения закономерностями направленного изменения их.

Нет никаких сомнений в том, что творческая дискуссия, широкий обмен мнений по книге Г. М. Бошьяна в целом и по отдельным развиваемым в ней положениям, а также развитие дальнейших работ в области изучения природы вирусов сыграют большую положительную роль и это безусловно будет способствовать дальнейшему прогрессу нашей науки.

Я. И. Раутенштейн

С. Л. Соболь. **История микроскопа и микроскопических исследований в России в XVIII веке.** Издательство Академии Наук СССР. М.—Л., 1949, 606 стр., 120 рис.

Книга С. Л. Соболя является свидетельством того, что советские ученые серьезно взялись за изучение славного прошлого отечественной науки. До Великой Октябрьской революции этой темой мало интересовались. В результате целый ряд русских открытий и изобретений был приписан зарубежным ученым, и лишь в наше время выясняется, какую большую роль в этом деле играли наши отечественные ученые. Чрезвычайно серьезная и плодотворная работа, которую проделал С. Л. Соболь в области истории микроскопических исследований, показала это с большой наглядностью. Так, например, автор выяснил, что начало научной микроскопии в России восходит к Ломоносову, который и является у нас действительным пионером этого дела. Ломоносов не только конструировал и изготовлял микроскопы, но впервые ввел микроскоп в химию как орудие научного исследования. Таким образом, приоритет в этом деле принадлежит не немецкому химику Маргграфу, как принято думать, а именно Ломоносову. До Ломоносова микроскоп употреблялся лишь при биологических исследованиях; наш гениальный ученый в 1744—1745 гг. дал этому инструменту принципиально новое назначение.

С. Л. Соболь начинает свое исследование по истории микроскопа в России с эпохи московской Руси. По его данным, еще в 70-х гг. XVII в. в русскую рукописную литературу уже проникли некоторые сведения о микроскопах, например, в переводном астрономическом трактате о луне Иоганна Гевелия. Первым русским, который непосредственно познакомился с микроскопом, был Петр I. С. Л. Соболь употребил немало усилий, чтобы с достоверностью выяснить эпизод свидания Петра с Левенгуком в мае 1698 г. в голландском городе Дельфте, причем Левенгук демонстрировал Петру картину кровообращения в хвосте угря. Петр приобретал микроскопы для Кунсткамеры за границей; но всего интереснее, что уже в Петровскую эпоху микроскопы стали изготовляться и в России, причем делал их «токарного и стеклянного дела мастер» Логин Шеппер и его ученик Иван Беляев. С. Л. Соболю удалось найти в Библиотеке Академии Наук и опубликовать в русском переводе времен Петра подлинную рукопись этого Шеппера, посвященную изложению начал оптики. По данным работы С. Л. Соболя, микроскопы были и у некоторых современников Петра — Якова Брюса и даже архиепископа Феофана Прокоповича. В 30—40-х гг. XVIII в. в академической Кунсткамере было уже 11 микроскопов разных систем. Автор дает подробное описание, с рисунками и снимками, этого любопытного «микроскопного инвентаря», пользуясь собранной им единственной в своем роде коллекцией старинных микроскопов, хранящихся в Отделении биологических наук АН СССР. Во времена Ломоносова при Академии Наук уже существовали механические мастерские, где работали русские мастера — оптики и инструментальщики, умевшие шлифовать линзы и изготовлять оптические инструменты, в том числе и микроскопы. Этим мастерам и заказывал инструменты Ломоносов.

В конце XVIII и начале XIX в. микроскоп, как показал в своей книге С. Л. Соболь, был в России уже привычным орудием исследования. При этом на научной сцене у нас появился ряд выдающихся ученых-микроскопистов. Из них С. Л. Соболь более подробно останавливается на личности и трудах профессора Петербургской медико-хирургической академии Мартына Матвеевича Тереховского, автора чрезвычайно интересной диссертации «De chao infusorio Linnaei» (1775), где он одновременно со Спалланцани поставил вопрос о природе и возникновении «наливочных животных», т. е. микроорганизмов, развивающихся в различного рода органических настоях. Тереховский не занимался морфологией этих мельчайших организмов. Его заинтересовала общебиологическая проблема «самопроизвольного зарождения». В результате своих экспериментальных исследований Тереховский высказался против возможности самопроизвольного зарождения. Поставив множество опытов с настойными животными и подвергнув их действию различных физических и химических агентов, Тереховский пришел к выводу, что это, действительно, живые существа — animalcula, как он их называет. Установив животную природу анималькулей, русский ученый поста-

вил вопрос: откуда же они возникают в настоях? Для ответа на этот вопрос он произвел новый ряд тщательных экспериментов, которые привели его к заключению, что самопроизвольное зарождение анималькулей ни при каких условиях не имеет места. Если они развиваются в жидкостях, то лишь потому, что они сами или их зародыши попадают туда извне. Таким образом, имя забытого русского ученого может быть поставлено в один ряд с именами Реди, Спалланцани и Пастера.

С. Л. Соболь, с присущей ему тщательностью в работе, не удовлетворился тем, что изложил взгляды Тереховского. Он взял на себя нелегкий труд перевести с латинского языка на русский весь текст его диссертации (в Приложениях) и тем дал возможность русским читателям детально познакомиться с этим замечательным сочинением нашего старинного микроскописта.

Интересны также сведения, которые С. Л. Соболь сообщает о другом забытом русском ученом XVIII в.— враче Александре Михайловиче Шумлянском. Последний напечатал в 1782 г. на латинском языке диссертацию: «De structura renum» («О строении почек»), где показал себя выдающимся микроскопистом. Шумлянский инъицировал почки окрашенными массами и впервые удивительно отчетливо разобрался в их микроскопической структуре. По мнению С. Л. Соболя, анатомические термины «мальпигиевы клубочки» и «петли Генле» вполне справедливо заменить названиями «клубочки и петли Шумлянского».

Весьма интересны также сведения, которые сообщает автор о создании русскими учеными в конце XVII в. ахроматического микроскопа. Он рассказывает о работах русских академиков — Леонарда Эйлера и его ученика Николая Фуса, которые дали теоретические расчеты для ахроматических объективов, предупредив в этом отношении ученых Западной Европы. На основе расчетов академиков замечательный русский изобретатель Иван Кулибин со своими мастерами уже в 70-х гг. XVIII в. построил первую опытную модель ахроматического микроскопа. Над этим изобретением продолжал работать русский академик Эпинус, который спустя десять лет сконструировал свой ахроматический микроскоп, впоследствии усовершенствованный известным физиком академиком Егором Ивановичем Парротом. Зарубежная наука утверждает, что первый ахроматический микроскоп построил голландский оптик ван Дейл в 1807 г., а затем Фрауэнгофер в 1811 г. Извлеченные С. Л. Соболем из архивов материалы показали, что академики Петербургской Академии Наук в сотрудничестве с русскими мастерами опередили зарубежных ученых на несколько десятилетий.

Мы указали только на незначительную часть материала, опубликованного в прекрасной работе С. Л. Соболя, которая заслуженно удостоена Сталинской премии. Надо заметить, что ее содержание значительно шире ее заглавия. Это не только история микроскопа, но и глава из истории биологических наук в России XVIII века.

Помимо увлекательного содержания книги, заслуживают быть отмеченными некоторые поучительные особенности научно-исследовательской работы ее автора. Бросается в глаза необыкновенная тщательность и точность его работы и добросовестное стремление, преодолевая технические трудности, разыскать и проверить все доступные источники и материалы. В силу этого выводы автора носят печать полной достоверности, и их было бы трудно оспаривать. В этом отношении начинающие историки естествознания могли бы многому поучиться у автора.

Таким образом, и по содержанию и по выполнению труд С. Л. Соболя, несомненно, является весьма крупным вкладом в историю нашего отечественного естествознания.

Б. Е. Райков

БИБЛИОГРАФИЯ

I. Общая микробиология

Горюнова С. В. Слизистые вещества. Oscillatoria.— Известия АН СССР, серия биол., 1950, 1, стр. 29—42, с библиографией (19 назв.).

Калина Г. П. Изменчивость патогенных микроорганизмов. Киев. Госмедиздат УССР. 1949. 156 стр. с илл.

Канаев И. И. Новое о вирусах. Природа, 1950, 1, стр. 71—72.

Леонова Н. А. Куколки тутового шелкопряда как материал для питательных сред в микробиологии.— Тр. Узбекского института эпидемиологии и микробиологии, т. III, 1949, стр. 105—107.

Метелкин А. И. Характерные черты исторического пути отечественной микробиологии.— Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1950, № 1, стр. 77—82.

Пептоны из хлопкового жмыха (для питательных сред). Авторы: М. И. Максианович, Н. А. Леонова, А. В. Благовещенский и И. И. Чикало.— Тр. Узбекского института эпидемиологии и микробиологии, т. III, 1949, стр. 76—79.

Проценко Д. Ф и Кирова К. А. Переделка природы дрожжей путем воспитания.— Научные записки Киевского гос. университета, т. VIII, вып. 5, 1949, стр. 173—179.

Шамис Д. Л. К проблеме активирования процессов жизнедеятельности промышленных дрожжей.— Тр. Третьей сессии АН Каз. ССР, Алма-Ата, 1949, стр. 197—309.

II. Сельскохозяйственная микробиология

Александровская Л. Н. Азотный обмен при вирусном заболевании хлопчатника.— Ученые записки Кабардинского гос. педагогич. и учительского института, вып. 2, 1949, стр. 127—154, с библиографией (24 назв.).

Беляков Е. В. Распространение азотобактера в целинных и культурных почвах пустынной и степной зонах Центрального Казахстана. Материалы по экологии азотобактера.— Изв. АН Каз. ССР, № 75, Серия освоения пустыни, вып. 5, (фактически: 1) 1949, стр. 49—97.

Брундза К. Жизнь бактерий и их влияние на урожай. Вильнюс. Гос. изд-во политич. и науч. лит-ры. 1949. 64 стр. с илл. Тираж 4100 экз. (на литовском языке). Цена 1 р. 25 к

Бурыхина Е. К. Фомоз капусты и меры борьбы с ним.— Сад и огород, 1950, № 1, стр. 52—56.

Выскварко Г. Г. Основные болезни чая и цитрусовых культур. Баку. Изд-во Азернешр. 1949, 28 стр. Тираж 1000 экз.

Гурлев А. С. и Зеленская О. А. Применение хлорпикрина для борьбы с килой капусты в защищенном грунте.— Сад и огород, 1949, № 12, стр. 62—64.

Дараселия Н. А. Развитие азотобактера в ризосфере чайного куста.— Почвоведение, 1950, № 1, стр. 35—38, с библиографией (11 назв.).

Жуковская П. Н. и Теппер Е. З. Изучение микрофлоры ризосферы овса, клевера и картофеля методом последовательных отмываний корней. Тр. московской с.-х. академии им. Тимирязева, вып. 41, 1949, стр. 54—63.

Ивановский Д. И. О двух болезнях табака.— Мозаичная болезнь табака. (Вступительная статья Г. М. Вайндрах). М. Медгиз. 1949. 172 стр. с илл. и 3 л. илл. Тираж 3000 экз., Цена в перепл. 7 р. 50 к.

Липецкая А. Д. Испытание фитонцидов в борьбе с сосудистым бактериозом капусты.— Сад и огород, 1950, № 1, стр. 51—52.

Лоренц Л. Я. К биологии стеблевой нематоды Ditylenchus dipsaci (Kühv 1857). Доклады Московской с.-х. академии им. Тимирязева, вып. 10, 1949, стр. 184—185.

Морочковский С. Ф. Пятнистость листьев шелковицы.— Ботанический журнал (Киев), т. VI, № 3, 1949, стр. 63—66.

Наумова Н. А. К вопросу экологической оценки поражаемости пшениц бурой ржавчиной.— Ботанич. журнал, 1949, № 6, стр. 618—628.

Новогрудский Д. М. Природные и культурные формы почвенных микроорганизмов.— Известия Академии наук Казах. ССР, № 76, серия почвенная, вып. 5, 1949, стр. 30—41.

Программа по микробиологии. (Для биолого-почвенного факультета гос. университетов). (Состав. З. Г. Разумовская). М. Изд. МГУ. 1950. 8 стр. Тираж 3000 экз. Цена не указ.

Проценко Е. П. и Штанько И. И. О дезинфекции корневой системы роз.— Сад и огород, 1949, № 12, стр. 50.

Пустовойт Г. В. Биотипы бурой ржавчины в Краснодарском крае (на пшенице). Научный отчет Краснодарской гос. селекционной станции за 1937—1948 гг. Вып. 1. Краснодар. 1949, стр. 343—352.

Федоров М. В. Влияние на азотофиксацию азотобактера веществ, связывающих тяжелые металлы.— Тр. Московской с.-х. академии им. Тимирязева, вып. 41, 1949, стр. 27—37.

Федоров М. В. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером различных соединений азота. Тр. Московской с.-х. академии им. Тимирязева, вып. 41, 1949, стр. 38—53.

III. Техническая и пищевая микробиология

Антонов М. В. Консервирование ягод пастеризацией.— Доклады Московской с.-х. академии им. Тимирязева, вып. 10, 1949, стр. 110—115.

Бармаш А. О режиме стерилизации консервов. Мясная индустрия СССР, 1949, № 6, стр. 40—44.

Герасимов М. А. Длительное оставление вина на дрожжевой гуще.— Виноделие и виноградарство СССР. 1950, № 1, стр. 31—32.

Гладкий Ф. С. Непрерывное брожение при переработке свекло-сахарной патоки на спирт. М. Пищепромиздат. 1949. 32 стр. с илл. Тираж 3000 экз. Цена 2 р. 30 к.

Квасников Е. И. Бактериальные болезни крепких и десертных вин. Ташкент. Изд. АН Узб. ССР. 1949, 36 стр. и 2 л. илл. Тираж 3000 экз. Цена 2 р.

Микробиология пищевой промышленности. Часть 3. Вып. 2. Б. С. Алеев и М. И. Ратнер. Микробиология зерна, муки, хлебных и кондитерских продуктов. М. Пищепромиздат. 1950. 92 стр. с илл. Тираж 5000 экз. Цена 6 р. 10 к.

Правила приготовления заквасок из сухих культур для кисломолочного масла и сметаны. Углич. Изд. Всесоюзн. науч.-исслед. института сыродельной промышленности. 1949. 11 стр. Тираж 8000 экз. Цена не указ.

Правила приготовления заквасок из сухих культур для сыров типа швейцарского. Углич. Изд. Всесоюзн. науч.-исследов. института сыродельной промышленности. 1949. 11 стр. Тираж 2000 экз. Цена не указ.

Прохоров М. И. Аэробная микрофлора мяса и органов больных телят. Ветеринария, 1950, № 1, стр. 47—49.

Рунов Е. Охлаждение молока и его микрофлора. Молочная промышленность, 1950, № 1, стр. 19—20.

ХРОНИКА

ПАМЯТИ Н. Ф. ГАМАЛЕЯ

29 марта 1950 г. исполнилась первая годовщина со дня смерти крупнейшего советского ученого, основоположника отечественной медицинской микробиологии, почетного академика Академии Наук СССР Н. Ф. Гамалея.

Мировоззрение Н. Ф. Гамалея формировалось в тот период, когда в России уже сложились оригинальные, совершенно самостоятельные русская классическая философия и естествознание, которые значительно укрепили и широко распространили те материалистические традиции, которыми Россия славилась еще со времени основоположника отечественной науки М. В. Ломоносова.

От классиков русского естествознания и философии Н. Ф. Гамалея воспринял передовые традиции, глубокую веру в силу науки и стремление к служению народу. Он стал материалистом, и весь путь его научно-общественной деятельности привел его к овладению диалектическим и историческим материализмом, к высокому званию члена партии Ленина — Сталина.

Еще в студенческие годы (1876—1880) он приступил к изучению развития органической жизни, к изучению эволюции организмов. Но сначала необходимо было овладеть биологической химией. С этой целью он решил пополнить знания, приобретенные в Одесском университете, посещением заграничных лабораторий. В те годы он особенно усердно изучает сочинения Герцена и Чернышевского, в работах которых были по-новому сформулированы крупнейшие теоретические проблемы современного им естествознания.

Философские статьи Герцена, в частности его «Письма об изучении природы», звучали, как набатный призыв к овладению естествознанием. Герцен писал: «Одна из главных потребностей нашего времени — обобщение истинных, дельных сведений об естествознании. Их много в науке, их мало в обществе; надобно втолкнуть их в поток общественного сознания, надобно их сделать доступными... Надобно дать им язык откровенный... Нам кажется почти невозможным без естествоведения воспитать действительно мощное умственное развитие» [1].

Великий ученый и революционер Чернышевский последовательно и резко ставил вопрос о том, что построение подлинно материалистического мировоззрения невозможно без развития естественных наук. Чернышевский дал толчок для материалистической разработки наиболее трудных разделов естествознания. Он смело бросил клич о познаваемости мира и увлекал на путь науки талантливую молодежь.

Свое естественно-научное образование Н. Ф. Гамалея дополнил специально медицинским образованием. В 1883 г. он кончает Военно-медицинскую академию, где слушал лекции и работал под руководством виднейших русских ученых: Боткина, Манассеина, Пашутина, Коломнина, Полотебнова, Тарновского и др. Получив звание лекаря, Николай Федорович возвращается в Одессу, где поступает ординатором в больницу. В Одессе Н. Ф. Гамалея тесно общается с И. И. Мечниковым и О. О. Мочутковским. Общение с ними оказало большое влияние на молодого врача.

Это были годы, когда возникшая микробиология поставила ряд общебиологических проблем: самопроизвольное зарождение, сущность брожений и гниения, значение кислорода для живых существ и др., когда перед учеными был открыт мир микробов — возбудителей заразных болезней человека и животных, когда был открыт факт изменения ядовитости бактерий и предохранительные прививки. Это были годы, когда закладывался фундамент иммунологии.

Вместе с И. И. Мечниковым Н. Ф. Гамалея становится основателем отечественной медицинской микробиологии, строителем ее как самостоятельной дисциплины естествознания и медицины (пропаганда и научное обоснование прививок против бешенства, открытие фильтрующихся вирусов как возбудителей заразных болезней и в том числе опухолей, применение противосибиреязвенных вакцин и др.). Николай Федорович становится создателем нового направления в учении об инфекции и иммунитете — иммунохимии (химические вакцины, учение о бактерийных ядах).

В 1894 г. вышла его работа, касающаяся изменчивости бактерий в зависимости от условий внешней среды. В 1898 г. Н. Ф. Гамалея первый установил явление лизиса бактерий и этим положил начало учению о бактериофагии и антибиотиках.

Все эти работы явились тогда новым словом в учении об инфекции и иммунитете. Свои многочисленные самостоятельные научные исследования, содержавшие огром-

[1] А. И. Герцен. Избранные философские сочинения, стр. 219, 1940.

ный экспериментальный материал и материалистические выводы, Н. Ф. Гамалея обобщил в своих книгах «Бактерийные яды» (1892), «Этиология холеры» (1893), «Основы общей бактериологии» (1899). Это были труды, которые охватывали вопросы о бактериях и их токсинах с общебиологической точки зрения. Главная идея этих монографий заключалась в том, чтобы показать несостоятельность витализма в этих вопросах, и показать, что инфекция есть только интоксикация бактерийными ядами и что бактерии подчиняются закону изменчивости.

Эти работы одновременно являлись крупными открытиями в области биологии и микробиологии. Вообще явления разрушения бактерий и вирусов в организме и изменчивости их всю жизнь глубоко интересовали Николая Федоровича, и его исследования много дали для понимания механизма этих явлений.

Н. Ф. Гамалея всегда был противником низкопоклонства и раболепия перед «западничеством».

Блестящим примером критического отношения Н. Ф. Гамалея к теориям и методам зарубежной науки и его непримиримой борьбы с широко распространенным тогда в России преклонением перед всем иностранным может служить его отношение к клеточной патологии Р. Вирхова. Убедившись в догматичности, односторонности и метафизичности этого учения, Николай Федорович вслед за Фр. Энгельсом и Сеченовым отнесся к ней отрицательно, подчеркивал ограниченность этой теории и несовместимость ее с доказанным всем развитием естествознания материалистическим взглядом единства всей живой природы. Свои представления о сущности болезненных процессов он изложил в своих лекциях по общей патологии (1898—1909). Н. Ф. Гамалея принимал активнейшее участие в практической борьбе с инфекционными заболеваниями. В результате своих многолетних работ по борьбе с людской чумой в Одессе (1901—1902), с холерой в Закавказье, Поволжье, Одессе и Петербурге (1904—1909), с сыпным и возвратным тифами с 1907 г. он приходит к выводу, что предохранительные прививки не имеют решающего значения в борьбе с этими инфекциями и что решающую роль играют широкие всесторонние профилактические мероприятия и, в первую очередь, улучшение социально-экономических условий. Это побудило Н. Ф. Гамалея приступить в 1910 году к изданию журнала «Гигиена и санитария». В программной статье этого журнала Н. Ф. Гамалея писал: «Наш орган ставит своим лозунгом — оздоровление России. Громадность и трудность этой задачи, ее отношение к основным социальным вопросам и те предметы, на которых мы рассчитывали сосредоточить нашу деятельность, будут видны из нижеследующего.

Нет сомнения, что печальное санитарное состояние России тесно связано с ее слабым экономическим, политическим и культурным развитием. Для России, ведь, типичны не только высокая смертность и распространение заразных болезней, но и громадный процент безграмотных, и постоянные голодовки, и господство трехполья, и ничтожная промышленность, отсутствие путей сообщения и т. д. Поэтому — писал Н. Ф.— мы сосредоточили все наше внимание на тех санитарных мероприятиях, которые важны для оздоровления России. Народное здоровье слишком ценно для государства, чтобы не быть предметом особых забот со стороны последнего. Народное здоровье есть фундамент, на котором покоится счастье народа и сила государства».

В журнале принимали участие: Н. И. Тезяков, З. П. Соловьев, Н. Н. Клодницкий, П. И. Куркин и др., и в нем помещались такие статьи, как, например, «фабриканты-отравители».

Н. Ф. Гамалея придавал большое значение делу популяризации научных знаний. В статье этого журнала «О популяризации здравоохранения» он писал: «В числе важнейших мер, которые могут быть предприняты к охране народного здравья, на первом месте стоит популяризация основных начал здравоохранения». «Самая главная сила человека есть знание. Оно сделало его царем земли и открыло путь к подавлению и упразднению болезней. Оно показало, что страшнейшие бичи человечества в этом отношении — заразные болезни — могут быть совершенно устранены. Оно отодвинуло в историческое прошлое те ужасные бедствия, которые наносили человечеству проказа, чума, оспа, сыпной и возвратный тифы, холера, малярия.

В годы первой мировой войны Николай Федорович продолжал заниматься борьбой с оспой, брюшным и сыпным тифом. Но мечтал он о том времени, когда наука займет достойное место в общественной жизни России, когда она будет пользоваться поддержкой государства. Это произошло только после Великого Октября.

Великая Октябрьская социалистическая революция открыла народам России путь к свободной, счастливой жизни и расцвету наук.

Под руководством создателей Советского государства Ленина и Сталина Республика Советов стала оплотом прогресса, свободы, науки и просвещения.

С первых дней существования советской власти передовые ученые, и в том числе Н. Ф. Гамалея, увидели в новом строе подлинное торжество тех идеалов, о которых мечтали долгие годы лучшие люди. При советской власти создались все условия для наиболее полного расцвета научно-общественной деятельности Н. Ф. Гамалея.

Н. Ф. Гамалея принимает активное участие в создании органов здравоохранения. По его инициативе начались работы по ликвидации оспы. Он принимает активное участие во всех съездах и конференциях по борьбе с заразными болезнями. В 1927 г Н. Ф. Гамалея становится одним из учредителей Всесоюзной ассоциации

работников науки и техники Советского Союза (Варнитсо). Он принимает активное участие в реформе медицинского образования и планирования сети медицинских институтов, издает ряд руководств, монографий и учебников по инфекциям и иммунитету.

Эти пособия представляют собой прекрасно составленные критические обобщения состояния науки об инфекции и иммунитете. В них подытожен огромный опыт его личной многолетней экспериментальной и практической работы в области инфекционных заболеваний, что делает их особо ценными для понимания теоретических и практических вопросов медицины.

Из громадного количества фактического материала Николай Федорович мастерской рукой извлекал наиболее ценное и важное. Благодаря этому главное в области иммунологии, не загроможденное второстепенными деталями, выявляется с достаточной ясностью и полнотой. Книги Н. Ф. Гамалея являются очень ценным вкладом в нашу литературу по инфекции и иммунитету. Они занимают видное место как у тех, кто занимается теоретической разработкой учения об иммунитете, так и у тех, кто проводит в жизнь практические достижения в этой области.

В своей большой научной и общественной деятельности по созданию и развитию самостоятельной отечественной науки о ликвидации заразных болезней Н. Ф. Гамалея уделял много внимания популяризации научных достижений медицины.

Этим Николай Федорович преследовал благородную цель распространения научно-медицинских знаний в народе и стремился демократизировать науку. Таким образом, и в этой области он неуклонно следовал славным традициям И. М. Сеченова, К. А. Тимирязева и др., которые считали популяризацию науки одной из важнейших задач естествознания и медицины.

Н. Ф. Гамалея высоко ценил значение санитарного просвещения и особое внимание уделял массовой агитации и пропаганде санитарных знаний.

Уменье говорить и писать популярно, для народа, он считал большим, важным и трудным искусством, и сам много работал над собой для того, чтобы им овладеть.

На советский период жизни и деятельности Николая Федоровича приходится бо́льшее число его научно-популярных статей, плакатов и брошюр по вопросам гигиены и здоровья рабочих, крестьян и их семей. Среди них пользовались особенно большим успехом и популярностью и неоднократно переиздавались большими тиражами на языках народов СССР следующие: «Оспа и оспопрививание», «Корь», «Дифтерия», «Грипп», «Бешенство», «Крысы и борьба с ними» и т. д.

В 1934 г. постановлением правительства Н. Ф. Гамалея было присвоено звание заслуженного деятеля науки, а в 1938 г. он был избран профессором кафедры микробиологии 2-го Московского медицинского института.

Большую работу вел Н. Ф. Гамалея в течение ряда лет (1939—1948) как бессменный председатель Всесоюзного общества эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов, в 1939 г. он избирается членом-корреспондентом АН СССР.

В 1940 г. научной и медицинской общественностью нашей страны было отмечено 80-летие со дня рождения и 55-летие врачебной, научной, организаторской, педагогической и общественной деятельности Н. Ф. Гамалея. Правительство высоко оценило заслуги Н. Ф. Гамалея, наградив его орденом Ленина.

На многочисленные поздравления и приветствия Николай Федорович ответил следующим письмом в газете «Медицинской работник»: «Позвольте через посредство вашей газеты принести глубокую признательность организациям и отдельным товарищам, почтившим меня своим вниманием в день 55-летия моей научной, педагогической деятельности. Этот радостный день был ознаменован высшей наградой, полученной мною от правительства Союза. Награда эта служит мне напоминанием о моем неоплатном долге перед Родиной, во славу которой я отдал все свои знания. Чрезвычайно велика моя признательность правительству и гениальному кормчему Сталину за их внимание к работе скромного ученого».

29 мая 1940 г. Академия Наук Союза ССР избрала Н. Ф. Гамалея почетным академиком, а в 1943 г. ему была присуждена сталинская премия. Н. Ф. Гамалея был пламенным патриотом своей Родины и активным борцом за мир.

По окончании Великой отечественной войны и в связи с капитуляцией гитлеровской Германии он обратился по радио к французскому народу со следующей речью: «Четыре года тому назад, летом 1941 г. я обращался по радио к французскому народу. Тогда гитлеровские злодеи предательски напали на нашу страну, развязавши кровавую Отечественную войну, сорвавшую наше мирное строительство, унесшую сотни тысяч жертв среди невинных стариков, женщин и детей, разорившую наши поселения и культурные ценности. Враг вторгся в наши границы, вооруженный до зубов всеми достижениями современной техники, упоенный своими дешевыми победами над остальной Европой. Он провозгласил безумную теорию молниеносной войны и преступное учение о господстве высшей расы.

Однако уже тогда, в первые дни войны, я, следуя мудрой оценке главы нашего народа и зная чудесную силу нашего социального строя, смело предсказал в своей французской радиопередаче, что гитлеровцы будут стерты впрах.

Сегодня я со всем демократическим миром переживаю счастливую минуту жизни, узнав, что злодейская гитлеровская Германия безоговорочно капитулировала.

Разумеется, нам нельзя еще вполне разоружиться, преступники должны быть

наказаны, произведенные ими разрушения должны быть восстановлены силами виновников. Должен быть организован такой порядок, который исключает на будущее время агрессию кровожадных хищников. Но и теперь, во всяком случае, мы можем дышать свободно, зная, что наиболее преступное, оставившее далеко позади все зверства прежних завоевателей, наступление на всемирную цивилизацию сокрушено успехами союзников и прежде всего нашей героической армией под гениальным руководством главного командования.

Слава Красной Армии! Слава советскому народу! Слава нашему Правительству! Слава Великому Сталину!»

Как известно, в 1944 г. постановлением правительства была создана Академия медицинских наук СССР и Н. Ф. Гамалея в 1945 г. был избран ее действительным членом. В том же году в связи с 220-летним юбилеем существования АН СССР он был награжден орденом Трудового Красного Знамени.

Н. Ф. Гамалея всегда подчеркивал ту большую помощь, которую наша партия и правительство уделяли науке и, в частности, микробиологии.

На конференции, посвященной памяти Л. Пастера, он говорил, что в Советском Союзе микробиология нашла свою истинную родину, что все открытия и завоевания этой науки применяются в нашей стране на благо всех трудящихся лучше, чем в капиталистических странах.

В 31-ю годовщину Великой Октябрьской социалистической революции Н. Ф. Гамалея написал статью, в которой вспоминал о далеких временах, когда в среде ученых господствовали соперничество, конкуренция, стяжательство, когда ни одно правительство ни в одной стране не считало себя обязанным поддерживать научные изыскания.

«В нашей стране произошли грандиозные перемены,— писал Н. Ф. Гамалея,— изменился государственный строй, изменились условия, в которых мы живем и работаем, изменился моральный кодекс людей, их духовный облик.

Настоящему советскому ученому чужды стяжательство и интриги, дороже всего ему поиски истины, служение отчизне, народу. Все личное, мелкое отступает в нашей действительности на задний план. Для нас главное в работе не материальные блага, а правда, которую научное открытие может принести всему народу, Родине. Поэтому в нашей жизни не может быть места мелким чувствам. Советский ученый не суживает своего горизонта до размеров только своего личного бытия. Его мысли и чувства направлены на благо и счастье всего народа. Поэтому мы за новое, передовое.

Начиная полезное дело, мы, все советские ученые, твердо знаем, что всегда встретим поддержку большевистской партии и нашего замечательного народа».

Эти прекрасные строки хорошо характеризуют облик этого ученого. Вот почему весь научно-общественный путь Н. Ф. Гамалея логически привел его в ряды партии Ленина — Сталина.

В марте 1948 г. почетный академик Н. Ф. Гамалея вступает в ряды ВКП(б).

В своем заявлении о приеме его в ряды партии он писал: «В период исключительно напряженной борьбы двух систем на идеологическом фронте, я хочу быть в партии Ленина — Сталина, чтобы в первых ее рядах бороться за торжество диалектико-материалистических идей, за демократическое преобразование мира против реакционных философствующих идеологий. Хочу итти с партией большевиков по верному пути — пути, ведущему в коммунистическое общество».

Эволюция взглядов Н. Ф. Гамалея являлась прекрасной иллюстрацией слов основателя нашей партии большевиков и Советского государства В. И. Ленина: «инженер придет к признанию коммунизма не так, как пришел подпольщик-пропагандист, литератор, а через данные своей науки... По-своему придет к признанию коммунизма агроном, по-своему — лесовод и т. д.».

Так писал Ленин в 1921 г. в своей исторической статье: «Об едином хозяйственном плане».

Установки новой мичуринской биологии были чрезвычайно близки Н. Ф. Гамалея и особенно были созвучны его работам по изменчивости бактерий. Мичуринское учение он рассматривал как новый высший этап материалистической биологии, как творческое развитие дарвинизма и, откликаясь на дискуссию на августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г. по докладу акад. Т. Д. Лысенко «О положении в биологической науке», Н. Ф. Гамалея писал: «Даже такая, специальная и мало доступная отрасль биологии, как микробиология, внесла свой вклад в учение о вегетативной гибридизации. Как важно поэтому уметь ослабить ядовитые микробы, превратить их в безвредные... Учение Мичурина открывает беспредельные горизонты в преобразовании природы. Огромное значение имеет и возможность превращения одного вида бактерий в другие. Практические последствия для человечества подобно вегетативной гибридизации, могущей привести к обезвреживанию бактерий, поистине неисчислимы, и что может быть почетнее и радостнее для ученых, чем борьба за избавление человека, животных и растений от опасных смертоносных болезней».

17 февраля 1949 г. Н. Ф. Гамалея исполнилось 90 лет со дня рождения. Указом Президиума Верховного Совета СССР выдающийся русский ученый-микробиолог был награжден вторым орденом Ленина.

«Правда» в редакционной статье писала в эти дни, что Н. Ф. Гамалея «в своих

исследованиях стоял всегда на позициях материализма: он был убежденным сторонником материалистического естествознания и много сделал для его пропаганды. В рядах борцов за материалистическое естествознание он шел плечом к плечу с такими корифеями русской науки, как Сеченов, Мечников, Тимирязев, Мичурин, Павлов».

Умер Н. Ф. Гамалея 29 марта 1949 г. на 91-м году жизни.

Жизнь и деятельность Н. Ф. Гамалея — подлинного сына народа — является блестящим примером неутомимого и самоотверженного служения науке и отечеству. Его научное наследие богато и многогранно. Оно долго еще будет служить предметом исследования и изучения со стороны не только бактериологов, вирусологов, иммунологов и эпидемиологов, но и представителей других медицинских и биологических специальностей.

Пример жизни и деятельности Н. Ф. Гамалея зовет советских ученых к творческой работе на пользу и во славу нашего народа, во имя полного торжества коммунизма.

И. С. Грязнов

О ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

В Академии Наук Армянской ССР научно-исследовательская работа в области микробиологии за последние годы проводилась следующими учреждениями: лабораторией микробиологии Института виноделия и виноградарства, лабораторией микробиологии Института земледелия АН АрмССР, ныне Института кормов и лугового кормодобывания Министерства сельского хозяйства Арм. ССР, лабораторией белка и ферментов бывшего Института животноводства АН Арм. ССР, перешедшего в систему Министерства сельского хозяйства, а также сектором микробиологии АН Арм. ССР.

В секторе микробиологии разрабатываются вопросы общего характера. Тематика же трех первых лабораторий вытекает из проблематики специализированных институтов.

Так, лаборатория микробиологии Института виноделия и виноградарства (зав. лабораторией канд. мед. наук А. М. Диланян) изучает: а) влияние факторов на хересующую способность хересных дрожжей; б) селекцию хересных дрожжей, в) установление изменения состава вин в динамике при хересизации.

За последние годы лабораторией выделено свыше 300 штаммов чистых культур винных эллипсоидальных дрожжей. Изучены их морфологические, культуральные и биологические свойства.

Впервые были получены одноотростчатые, двуотростчатые и многоотростчатые гигантские колонии винных эллипсоидальных дрожжей, что представляет большой теоретический и практический интерес.

Опыты, поставленные в лабораторных условиях, показали, что часть дрожжевых культур Sacch. ellipsoideus armeniacus обладает высокобродильными (18°) и высокохересующими свойствами. Различные хересующие культуры обладают различной степенью хересующей способности.

Полупроизводственные и производственные опыты подтвердили лабораторные данные, показывающие, что продолжительное оставление вин на дрожжевых осадках способствует ускоренной хересизации их, упрощая и ускоряя технологию вин «Аштарак» (типа Херес). На основании проведенных работ Лаборатория рекомендует винодельческому производству Армении новую технологию получения вин «Аштарак» (типа Херес), а также дрожжевые культуры Sacch. ellipsoideus armeniacus № 12, 22, 28, 47 и др.

В настоящее время лаборатория занимается установлением изменения состава вин «Аштарак» по предлагаемой ею технологии, проводит микробиологические исследования испытуемых дрожжевых культур.

Проводятся лабораторные опыты по непрерывной хересизации вин по методу, предлагаемому проф. Г. Г. Агабальянцом.

Лаборатория также занимается изучением состава дрожжей Sacch. ellipsoideus путем спектрального анализа, изучением факторов, влияющих на хересующую способность хересных дрожжей, а также селекцией хересующих дрожжей.

Некоторые результаты проведенных работ опубликованы в изданиях АН Арм. ССР.

Лаборатория почвенной микробиологии Института земледелия АН Арм. ССР (зав. лабораторией канд. биол. наук А. П. Петросян) за последние два-три года выполняла ряд тем, касающихся изучения экологических особенностей клубеньковых бактерий в различных почвенно-климатических условиях Арм. ССР.

При изучении клубеньковых бактерий некоторых сортов фасоли, распространенных в Арм. ССР (канд. биол. наук Э. Х. Азарян), еще раз подтвердилась специфичность клубеньковых бактерий в отношении различных сортов бобовых растений. Выделены и изучены некоторые активные, вирулентные штаммы клубеньковых бактерий фасоли, которые переданы производству.

При изучении влияний сроков сева на интенсивность клубенькообразования у бобовых растений (А. П. Петросян) выяснилось, что различные сроки сева сильно влияют на клубенькообразование: у арахиса оптимальным сроком сева является начало июня, для нута — зимний посев (декабрь) или ранняя весна (март), для маша Vigna sinensis ранневесенний и осенний сроки. Повидимому, это зависит от интенсивности роста данного растения в период вегетации.

При изучении коррелятивной зависимости между количеством клубеньков и весом бобовых растений (А. П. Петросян) выяснилось, что между количеством клубеньков и весом бобовых растений нет никакой зависимости. Кроме этого, установлено также, что на одном и том же участке почвы различные сорта одного и того же бобового растения заражаются клубеньковыми бактериями с различной интенсивностью.

Для изучения экологических особенностей клубеньковых бактерий Арм. ССР (А. П. Петросян) собран довольно большой материал для различных почвенно-климатических условий Арм. ССР (низменных, предгорных, горных и высокогорных районов). Выделены в чистую культуру клубеньковые бактерии люцерны, эспарцета, фасоли и др., определена их вирулентность и изучаются морфологические, биохимические и культуральные их свойства.

В лаборатории белка и ферментов Института животноводства (руководитель лаборатории чл.-корр. АН Арм. ССР, д-р естественных наук М. А. Тер-Карапетян) микробиологические работы ведутся в области изучения технологии дрожжеподобных микроорганизмов, которые имеют определенное значение в биохимической переработке сельскохозяйственных и промышленных целлюлозных отходов.

Исследования ведутся по следующим направлениям:

1) приготовление из сельскохозяйственных и промышленных отходов питательных сред;

2) технология получения кормовых дрожжей в лабораторном и полузаводском масштабах;

3) изучение биохимии бродильных процессов и обмена веществ микроорганизмов.

По вопросу приготовления питательных сред лабораторией установлен ряд стандартных методов получения максимальных выходов усвояемых углеводов из различного рода целлюлозного сырья (производственный выход 40—45% от сухого веса сырья).

По вопросу технологии выращивания микроорганизмов за последние три года лаборатория обращала основное внимание на усовершенствование техники размножения микроорганизмов.

В этом отношении важным успехом в работах лаборатории является установление лабораторного и полузаводского режима технологического процесса, при котором размножение микроорганизмов происходит в логарифмической фазе с почти максимальной скоростью почкования.

Установлены также условия обогащения среды солями, при которых дрожжеподобные микроорганизмы размножаются (без угнетения), как на сусле и синтетических средах. Эти среды испытывались в лабораторных и полузаводских условиях в объеме 100—150 л (производственный выход из редуцирующих веществ среды — 240%).

Важнейшие работы лаборатории развертываются в области изучения биохимии и обмена веществ микроорганизмов. В частности, изучаются факторы внешней среды, влияющие на кинетику размножения и накопление внутри клеток белковых веществ, витаминов и других специфических веществ.

Все это дает возможность получать дрожжи различной кормовой ценности.

Наличие же при лаборатории полузаводской установки позволяет выращивать дрожжевые грибы в стерильных условиях в больших количествах, используя целлюлозные отходы.

Таким образом, вышеуказанные микробиологические учреждения Академии Наук Арм. ССР в основном занимаются изучением вопросов, соответствующих профилю специализированных институтов. Более же широкое и всестороннее изучение микробиологических вопросов осуществляется сектором микробиологии АН Арм. ССР (зав. сектором д-р биол. наук проф. А. К. Паносян), где сконцентрировано большинство микробиологов республики. Сектор занимается разработкой вопросов общей, почвенной и промышленной микробиологии, а также изучением бактериальных заболеваний растений. Исследования ведутся по двум проблемам.

1. Направленное изменение и отбор микроорганизмов для применения в сельском хозяйстве, промышленности и медицине

Проведено изучение биологических особенностей азотфиксаторов почв Армении. Выявлены морфологические и биологические свойства этой группы микробов (кандидаты биол. наук А. В. Киракосян и А. А. Меграбян), а также факторы, влияющие на интенсивность фиксации атмосферного азота азотобактером в отдельных типах почв и в ризосфере сельскохозяйственных культур (А. К. Паносян, Ш. С. Тараян, Р. Ш. Арутюнян); часть этих работ опубликована в микробиологическом сборнике сектора (вып. 3 и 4).

Сектор микробиологии занимается также выяснением роли микроорганизмов в почвообразовательных процессах грунтов, обнаженных вследствие спуска уровня воды озера Севан, с целью освоения этих почв (руководитель А. К. Паносян). Изучено: 1) накопление и разрушение органических веществ под различными формациями растений; 2) влияние обработки на накопление и разрушение органических веществ и 3) структурообразование почвы.

Проведенные работы показали, что почвообразовательный процесс, накопление и разрушение органических веществ протекают нормально в тех обнаженных грунтах, где наряду с бобовыми растениями растут многолетние злаковые травы. В грунтах же, где возделываются только зерновые культуры — пшеница, ячмень и т. д., количество органических веществ не только не увеличивается, а наоборот, имеющиеся в этих грунтах незначительные их количества убывают, вследствие чего урожай сельскохозяйственных культур уменьшается вместе со снижением грунтовых вод.

Большая работа проведена также по изучению микроорганизмов, обладающих антагонистическими свойствами (А. К. Паносян, ст. научн. сотр. Р. О. Мирзабекян, В. Г. Туманян, В. А. Мурадян, аспирант Э. Г. Африкян). Часть этих работ проводится совместно с Институтом микробиологии АН СССР.

По промышленной микробиологии за последние годы проведено изучение микрофлоры плодов, ягод, вин и хлебных заквасок (канд. биол. наук Ф. Г. Саруханян, Р. С. Каримян, А. Г. Севоян, Р. М. Ахинян), что дало возможность выяснить как общую, так и дрожжевую микрофлору изучаемых объектов.

Путем селекции выделенных штаммов хлебопекарных дрожжей удалось получить дрожжи с высокой подъемной силой, которые являются разновидностью Sacch. cerevisiae. Эти штаммы названы «Ереванские хлебопекарные дрожжи № 16», и в настоящее время они с успехом применяются в хлебной промышленности Арм. ССР.

Изучение биологии плодовоягодных дрожжей показало, что среди них встречаются разновидности Sacch. ellipsoideus, которые могут сбраживать как плодоягодные сусла, так и виноградный сок.

Среди дрожжевой микрофлоры плодов и ягод встречаются дрожжеподобные грибы, которые могут утилизировать пентозы сельскохозяйственных отходов. Среди них удалось выделить дрожжи, названные нами Torulopsis armeniaca; в настоящее время проводится подбор наилучших сред для этих дрожжей. Исследования, произведенные над виноградом сорта Кахет (черного цвета), показали, что среди селекционированных дрожжей имеются разновидности Sacch. ellipsoideus, которые обладают способностью сбраживать большие концентрации сахара (30%) и образовывать спирт в большом количестве (16—17°).

Ввиду особо важного значения применения местных рас ацидофильных бактерий в медицине и ветеринарии, с 1949 г. начато выделение, отбор и направленное воспитание местных рас ацидофильных молочнокислых бактерий (канд. техн. наук Л. Я. Ерзинкян). В течение 1949 г. из 104 образцов фекалий было выделено 882 штамма молочнокислых бактерий и 42 штамма различных дрожжей, симбиотирующих с ними. Из указанного количества было отобрано 32 штамма ацидофильных бактерий как наиболее активных. Из них в 1949 г. 7 штаммов были подвергнуты направленному воспитанию, в результате чего было получено 4 активных штамма местных ацидофильных молочнокислых бактерий, которые в июле, августе и сентябре 1949 г. были подвергнуты широкому испытанию в Ереванской детской клинике и гарнизонном госпитале. Для лечебных целей в секторе микробиологии было изготовлено 4600 условных сокслетовских бутылок (700 л) ацидофильных продуктов, в том числе для детской клиники 607 л. Лечение больных, страдающих острыми формами желудочно-кишечных и кожных заболеваний, производилось по разработанному Л. А. Ерзинкяном методу, в результате чего за указанный период было вылечено 205 тяжело больных детей и взрослых.

2. Биологические особенности возбудителей бактериозов сельскохозяйственных культур и меры борьбы с ними

По этой проблеме за последние годы проводится изучение бактериального рака томатов, являющегося опасным карантинным объектом (канд. с.-х. наук Р. М. Галачьян). В целях обоснования системы мероприятий по борьбе с бактериальным раком томатов и для ликвидации очагов этой инфекции изучены ареалы распространения данной болезни по отдельным районам республики, внешние симптомы проявления и течения болезни и диагностические особенности в условиях Армении. Кроме того, изучены биохимические и морфологические свойства возбудителя, его патогенные свойства и упрощенные методы для обнаружения болезни. В целях изучения поражаемости разных сортов томатов бактериальным раком разработаны методы провокационных посевов. В настоящее время, одновременно с изучением сортоустойчивости томатов, изучаются иммунологические свойства белков различных сортов томатов. В целях оказания помощи производству составлены две инструкции: «по сбору и пересылке образцов томатов, пораженных бактериальным раком, и учету заболевания в полевых условиях» и «по борьбе с бактериальным раком томатов применительно к местным условиям».

Заболевания, вызываемые представителями сапрофитной группы Bacillus mesentericus, приспособившимися к паразитированию на растениях, приобретают особое

значение в условиях Арм. ССР. Ранее сектором микробиологии было впервые выявлено и изучено вредоносное заболевание абрикоса и персика, вызываемое этим микробом в Армении и названное бактериальным побурением (канд. биол. наук С. А. Авакян; Микробиологический сборник, АН Арм. ССР, № 2).

За последние годы выявлено не менее вредоносное заболевание плодов кабачков (вершинное побурение), возбудитель которого относится также к группе B. mesentericus (канд. биол. наук С. А. Авакян). Изучены морфологические, биохимические и культуральные свойства возбудителя, доказана его патогенность. Изучены вредоносность и распространенность заболевания. В настоящее время изучаются пути распространения этой инфекции, что даст возможность разработать меры борьбы с ней.

Выявлены также случаи поражения B. mesentericus плодов айвы, груши, арбуза и других культур в полевых условиях.

Изучается распространенность фитопатогенных форм B. mesentericus в почве и связь между количеством их в почве и заболеваниями культивируемых растений с целью разработки эффективных мер борьбы.

В целях использования микробов-антагонистов для борьбы с возбудителем бактериального увядания абрикоса (Р. О. Мирзабекян, Н. А. Карапетян) изучены биохимические, морфологические и прочие свойства разных антагонистов. Проведено испытание действия различных антибактериальных веществ против возбудителя бактериального увядания абрикоса. Выяснилось, что применение некоторых антибиотиков против этого заболевания дает положительный результат.

Работы сектора микробиологии опубликованы в четырех выпусках микробиологического сборника, из которых два вышли в 1949 г. Работы печатались также в других периодических изданиях АН Арм. ССР и в виде монографий.

А. К. Паносян

34

СОДЕРЖАНИЕ

Л. Д. Штурм. Некоторые наблюдения над развитием Vibrio desulfuricans в аэробных условиях 289
Г. Л. Селибер. Реакции распада и синтеза при разложении жира бактериями, восстанавливающими сульфаты 294
Е. Н. Мишустин и В. А. Мирзоева. Растительные пояса гор и их отражение в составе бактериального населения почвы 299
Р. А. Менкина. Бактерии, минерализующие органические соединения фосфора. 308
Д. М. Новогрудский и З. Ф. Теплякова. Почвенная целлюлозоразрушающая микохитридия Rhizophlyctis rosea 317
Н. В. Орлова. Образование ацетоина и 2,3-бутиленгликоля культурой Aerobacter aerogenes 326
М. Я. Калюжный. Содержание воды и некоторые свойства дрожжей, выращенных на средах с различным содержанием солей натрия 338
А. Л. Бычковская. Анаэробная регенерация льняной мочильной жидкости и пути ее ускорения 348
Е. В. Рунов, Е. П. Коноплева и А. П. Сокольская. Бактериофаг в сыроделии. II. Устойчивость молочнокислых стрептококков к бактериофагу из сыра 355
Л. М. Тарасевич. О получении выкормок тутового шелкопряда, свободных от желтухи 364
М. В. Федоров. Теоретическое значение исследований В. С. Буткевича по изучению превращений белковых веществ в растительных организмах и химизму образования в них органических кислот 369
Критика и библиография 384
Хроника 393

Т 03499 Подписано к печати 20. VII. 1950 г. Печ. л. 7 + 2 вклейки
Уч.-изд. л. 10,7 Тираж 5000 экз. Заказ 358

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.